

134
24°



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION DE LA CONCENTRACION DE SODIO INTRACELULAR EN
NEURONAS Y SU RELACION CON LOS MECANISMOS DE CONTROL DEL
VOLUMEN CELULAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA:

ANDRES NANI VAZQUEZ

Dir. Dr. Francisco Javier Alvarez Leefmans

FACULTAD DE CIENCIAS
DIRECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "REGULACION DE LA
CONCENTRACION DE SODIO INTRACELULAR EN NEURONAS Y SU RELACION CON LOS
MECANISMOS DE CONTROL DEL VOLUMEN CELULAR"

realizado por el Sr. Andrés Nani Vázquez

con número de cuenta 8659556-8 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	Dr. Francisco Javier Alvarez Leefmans
Propietario	Dra. María Luisa Fanjul Peña
Propietario	BIÓL. Julio Alejandro Prieto Sagredo
Suplente	Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez FACULTAD DE CIENCIAS
Suplente	M. en C. Manuel Miranda Anaya

Firma
Escuela Departamental de Biología
M. en C. Alejandro Martínez Mena
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

Firma
Firma
Firma
Firma

*A MIS PADRES Y HERMANOS, POR SU CARIÑO E INAGOTABLE CAUDAL
DE ESTIMULOS A LO LARGO DE MI CARRERA.*

*A LA FAMILIA HERNANDEZ MARQUEZ, POR ABRIRME LAS PUERTAS
DE SU CORAZON.*

*A RUTH FRANCO, QUIEN ME HA ENSEÑADO LA VERDADERA ESCENCIA
DE LAS COSAS.*

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Francisco Javier Alvarez Leefmans, maestro y guía, por su paciencia y tenaz estímulo en la realización de este trabajo. Además de las facilidades de espacio y equipo brindadas en el laboratorio a su cargo.

A mis compañeros y amigos:

A Sergio Márquez Baltazar por su incommensurable apoyo en la realización y análisis de los experimentos.

Al Biólogo Julio Altamirano, por sus críticas revisiones y acertadas sugerencias al manuscrito.

Al Ing. José R. Fernández, por el cauteloso adiestramiento en el manejo del equipo electrónico y de computación, así como en la preparación del material gráfico.

Al Dr. Sergio Márquez Gamiño y Dr. Humberto Cruzblanca, por haberme iniciado en el camino de la biofísica.

A todos ellos, mi más profunda consideración y agradecimiento.



***ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE
NEUROBIOLOGIA DE LA DIVISION DE NEUROCIENCIAS DEL
INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA, BAJO LA DIRECCION
DEL Dr. FRANCISCO JAVIER ALVAREZ LEEFMANS.***

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

a_x^i	Actividad intracelular del ión x, (mM).
a_x^o	Actividad extracelular del ión x, (mM).
$a_{Cl^-}^i$	Actividad intracelular de Cl^- , (mM).
CD	Corriente Directa.
E	Potencial de Donnan.
E_{Cl^-}	Potencial electroquímico de Cl^- , (mV).
E_{K^+}	Potencial electroquímico de K^+ , (mV).
E_m	Potencial de membrana, (mV).
E_{ESI}	Potencial del electrodo selectivo a iones, (mV).
ΔE_m	Diferencia de potencial, (mV).
F	Constante de Faraday (96487 C/mol).
γ	Coficiente de actividad.
h	Cociente volumen/área (cm).
I	Fuerza iónica.
I_{Na^+}	Corriente de Na^+ .
K_{ij}^{POT}	Coficiente de selectividad del ión i respecto al ión j.
MDSI	Microelectrodos Dobles Selectivos a Iones.
$\Delta\pi$	Diferencia de presión osmótica.
$\Delta\pi=0$	Equilibrio osmótico.
$\Phi_{x\pm}$	Flujo neto del ión x ($\mu\text{moles/cm}^2\cdot\text{s}$)
q_m	Carga eléctrica (C).
R	Constante universal de los gases (8.314 V·C/K·mol).
R	Resistencia eléctrica (Ω).
Rn	Solución Ringer normal.
T	Temperatura absoluta ($^{\circ}K$).
TTX	Tetrodotoxina.
t=0	Tiempo inicial.
t= ∞	Tiempo infinito.
VCA	Volumen Celular Acuoso.
z_i	Valencia del ión i.
$[x^{\pm}]_i$	Concentración intracelular del ión x, (mM).

INDICE

1 INTRODUCCION

1.1 Fundamento general.....	1
1.2 Hipótesis de trabajo.....	4
1.3 Objetivos específicos.....	5
1.4 Fundamentos teóricos.....	6
1.5 Hipótesis de la "bomba y fuga".....	10
1.6 La bomba de Na^+ (ATPasa de Na^+/K^+).....	11

2 METODOLOGIA

2.1 Microelectrodos dobles selectivos a iones, (MDSI).....	12
2.2 Elaboración de MDSI.....	15
2.3 Procedimiento de registro.....	20
2.4 Calibración de los MDSI de Na^+ , K^+ y Cl^-	22
2.5 Material biológico.....	25
2.6 Preparación del material biológico.....	28
2.7 Soluciones experimentales.....	29

3 RESULTADOS

3.1 Aumento en la concentración intracelular de Na^+ al inhibir la bomba de Na^+ : flujo neto de Na^+	30
3.2 Efecto de la inhibición de la bomba de Na^+ sobre la $[\text{K}^+]_i$	33

3.3 Efecto de la ouabafina sobre la a_{Cl}^i	36
3.4 Efecto de la amilorida y del ácido propiónico sobre la $[Na^+]_i$	39
3.5 Estudios preliminares del efecto de la TTX sobre la $[Na^+]_i$	45
4 DISCUSION	
4.1 Tasa de aumento en la $[Na^+]_i$ y flujo neto de Na^+	48
4.2 La ouabafina produce una disminución en la $[K^+]_i$ que podría contribuir con la disminución del volumen celular acuoso, (VCA).....	49
4.3 El Cl^- intracelular aumenta durante la inhibición de la bomba de Na^+	50
4.4 Correlación de los resultados obtenidos con la fisiopatología del daño neuronal postisquémico.....	51
4.5 Naturaleza de las vías de entrada de Na^+ durante la inhibición de la bomba de Na^+ y en estado de reposo.....	52
4.5.1 La amilorida y el ácido propiónico producen cambios en la $[Na^+]_i$	52
4.5.2 La TTX produce una disminución en la $[Na^+]_i$ en condiciones de reposo.....	56
5 CONCLUSIONES	59
6 REFERENCIAS	60

1 INTRODUCCION

1.1 Fundamento General

El mantenimiento y la regulación del volumen celular acuoso (VCA) son funciones vitales para todas las células. Debido a la presencia de aniones proteínicos que no permean la membrana plasmática, las células animales tienden a edematizarse (hincharse) en medios fisiológicos, por la entrada de agua y pequeños solutos (ej: iones Na^+ y Cl^-) a los que la membrana es permeable. Esto se debe a que las macromoléculas intracelulares ejercen un gradiente de presión coloidosmótica dirigido hacia el interior celular. De no existir mecanismos que contrarresten este gradiente, las células ganarían agua e iones y aumentarían de volumen pudiendo llegar a su lisis. En otras palabras, los iones y el agua se distribuirían a través de la membrana hasta alcanzar el equilibrio predicho por la teoría de Gibbs-Donnan. Sin embargo, las células animales son capaces de mantener su volumen constante en el líquido extracelular fisiológico, no obstante carecer de una pared celular rígida como las células vegetales. ¿Qué es lo que previene el edema celular coloidosmótico bajo condiciones fisiológicas, evitando que los iones y el agua se distribuyan siguiendo las fuerzas de Gibbs-Donnan? Según esta teoría, en el estado de equilibrio, la concentración intracelular de solutos debería de ser mayor que la del medio extracelular, lo cual resultaría en una menor concentración de agua intracelular (potencial químico) con respecto al medio externo. Este desbalance hidrostático genera un flujo neto de agua a través de la membrana plasmática, hasta que se alcanza el estado de equilibrio. Debido a la distensibilidad y permeabilidad hidráulica de la membrana plasmática de las células animales, cuando se alcanza el estado de equilibrio de Gibbs-Donnan, éstas deberían aumentar

de volumen, llegando incluso hasta su lisis en un "intento" por abatir el gradiente de presión hidrostática generado por el desbalance de agua y solutos mencionados. Sabemos que no obstante la presencia intracelular de macromoléculas orgánicas impermeantes, los iones inorgánicos permeantes *no* se encuentran distribuidos de acuerdo con las fuerzas de Gibbs-Donnan. Si así fuese, la osmolaridad de la fase acuosa intracelular sería 25 a 30 mOsmoles/l mayor que la de la fase acuosa extracelular, lo cual, en una célula típica de mamífero equivaldría a una diferencia de presión hidrostática a través de la membrana plasmática de 6,587 a 7,904 mm de H₂O a 37°C (Alvarez-Leefmans y Reuss, 1996). Sin embargo, estudios de las propiedades osmóticas en los eritrocitos revelan que la presión hidrostática intracelular es sólo 2 ó 3 mm de H₂O mayor que la del medio extracelular (Rand y Burton, 1964) lo que equivaldría a una concentración intracelular de solutos de aproximadamente 0.01 mOsmoles/l más alta que la del medio extracelular. La virtual inexistencia de gradiente de presión hidrostática a través de la membrana indica que las células animales no se encuentran en equilibrio de Gibbs-Donnan. Esto implica que las células están dotadas de mecanismos de transporte de agua y solutos (canales y transportadores) que les permiten contrarrestar las fuerzas de Gibbs-Donnan, manteniendo su volumen acuoso constante. Así por ejemplo, el Na⁺ que entra a la célula, ya sea a través de canales o transportadores, impulsado por su gradiente electroquímico, es expulsado activamente de la misma, mediante la operación continua de la bomba de Na⁺/K⁺ (o simplemente bomba de Na⁺), de tal manera que la membrana plasmática se comporta "como si fuese" impermeable al Na⁺ y al K⁺, por lo menos en el estado de reposo. De acuerdo con la hipótesis de la "bomba y fuga" propuesta por Tosteson y Hoffman en 1960, el hinchamiento celular coloidosmótico se previene por la operación continua de la bomba de Na⁺ que expulsa activamente el Na⁺

citoplasmático a una tasa igual a la que fluye hacia el interior, impulsado por su gradiente electroquímico. Esta hipótesis predice que si se inhibe la bomba de Na^+ se produce una "inundación" del compartimiento intracelular por agua y solutos. Como la membrana plasmática de las células animales es distensible, a diferencia de las células vegetales cuya pared celular es rígida, se produce la entrada de agua y solutos, generando el hinchamiento y la eventual lisis celular.

En otras palabras, la hipótesis de Tosteson y Hoffman predice que si se inhibe la bomba de Na^+ , las células se cargarán de Na^+ y de Cl^- . El influjo de ambos iones se acompañará a su vez por la entrada osmótica de agua, lo que resultará en el aumento del VCA. En ciertos tipos celulares se ha observado este incremento del VCA ante la inhibición de la bomba de Na^+ con ouabaina (Macknight y Leaf, 1977). Sin embargo, medidas directas del VCA en células individuales (neuronas de *Helix aspersa*) han mostrado que dicho aumento del VCA es transitorio, inexistente, o más aún, lejos de efectuarse, la respuesta más frecuente es una *disminución* del VCA (Alvarez-Leefmans, Gamiño y Reuss, 1992). Estas observaciones han hecho necesario postular que los mecanismos del mantenimiento del VCA varían con el tipo celular, o más probablemente, involucran otros sistemas adicionales de transporte de iones o distintos a los considerados clásicamente por la hipótesis de Tosteson y Hoffman, también conocida como la hipótesis de la "bomba y fuga". Más aún, las observaciones referidas demuestran que esta hipótesis es incompleta (Alvarez-Leefmans, et al. 1994). Estos hallazgos sugieren que en el control del VCA están implicados mecanismos insensibles a la ouabaina, distintos de la bomba de Na^+ . El tema reviste gran importancia dado que a la falla en los mecanismos de control del VCA subyacen el edema y eventual lisis celular, fenómeno al que

están expuestas las células especialmente las neuronas, en ciertas condiciones patológicas tales como la anoxia postisquémica o la hipoglucemia, que resultan en una falla energética celular por disminución de ATP con el consecuente paro de los sistemas de transporte activo responsables del balance osmótico celular.

1.2 Hipótesis de trabajo

De acuerdo con los hallazgos considerados en la sección 1.1, la inhibición de la bomba de Na^+ resulta en cambios del VCA no contemplados por los postulados más elementales de la hipótesis de Tosteson y Hoffman. En vista de ello, en el presente trabajo se plantearon las siguientes hipótesis: 1) la disminución del VCA al inhibir la bomba de Na^+ sugiere una pérdida neta de agua y partículas osmóticamente activas de la célula. En este trabajo se postula que el K^+ , por ser el catión intracelular más abundante, y dado que su gradiente electroquímico está dirigido hacia el exterior celular, podría contribuir, junto con un anión, a la disminución en el VCA observada al inhibir la bomba de Na^+ ; 2) se postula que, en virtud del principio de electroneutralidad, el Cl^- o algún anión orgánico, podría ser el co-ión que acompaña al K^+ en este eflujo neto de partículas osmóticamente activas; 3) ya que en algunas células la disminución del VCA fue precedida por una o más fases de hinchamiento inicial, se postula que debe existir una ganancia neta, pero transitoria, de partículas osmóticamente activas. Debido a que el Na^+ es el catión extracelular más abundante, y dado que su gradiente electroquímico está dirigido hacia el interior celular, se sugiere que este catión acompañado de un anión, probablemente el Cl^- , y de agua son los responsables de inducir esta respuesta inicial transitoria. 4) En estas neuronas se postulan por lo menos dos vías de entrada del Na^+ : a) canales específicos sensibles

a TTX, y b) el intercambiador Na^+/H^+ .

El objetivo general del presente trabajo es entender la naturaleza de los mecanismos que subyacen al mantenimiento del VCA, utilizando como modelo experimental neuronas del caracol terrestre *Helix aspersa*.

1.3 Objetivos específicos

Aunque el título de este trabajo hace énfasis en el estudio de la regulación de la concentración de sodio intracelular y su importancia en el control del VCA, el hallazgo en estas neuronas de una disminución en el VCA al inhibir la bomba de Na^+ , hizo necesario expandir los objetivos originales, de tal manera que también se estudió el papel que juegan los flujos netos de los iones K^+ y Cl^- en esta disminución del VCA.

Para probar algunas de las premisas derivadas de la hipótesis de Tosteson y Hoffman, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1.- Medir en neuronas identificadas de *H. aspersa* las tasas iniciales de cambio en la concentración intracelular de los iones Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$), K^+ ($[\text{K}^+]_i$), y la actividad de Cl^- ($a_{\text{Cl}^-}^i$), así como los flujos netos de estos iones, durante la inhibición farmacológica de la bomba de Na^+ con ouabaína, con el objeto de correlacionar los movimientos de estos iones a través de la membrana plasmática con los cambios del VCA previamente descritos en estas células cuando se inhibe la bomba de Na^+ (Alvarez-Leefmans, Gamiño y Reuss, 1992).

2.- Explorar, tanto en el estado de reposo como durante la inhibición de la bomba de Na^+ , la naturaleza de las vías de entrada de Na^+ a través de la membrana. Se estudiaron dos posibles vías: a) canales selectivos para este catión sensibles a tetrodotoxina (TTX) y b) el

intercambiador Na^+/H^+ .

1.4 Fundamentos teóricos

Para entender el comportamiento osmótico de las células en un medio isosmótico, es necesario considerar los principios que rigen la distribución de iones en ambos lados de una membrana semipermeable en un sistema físicoquímico simple. Esta noción desarrollada por Josiah Willard Gibbs (1839-1903) y Frederick George Donnan (1870-1956) es conocida como equilibrio de Gibbs-Donnan o equilibrio de Donnan. Considérese el sistema artificial de paredes rígidas mostrado en la figura 1, compuesto de los compartimientos "1" y "2". Ambos se encuentran separados por una membrana permeable al agua y a los iones (como K^+ y Cl^-), pero impermeable a proteínas. En la condición inicial, ($t=0$), se añade una solución de KCl al compartimiento "2", mientras que otra solución hecha con la sal de K^+ (proteinato de K^+ (KA)) de la misma concentración, se añade al compartimiento "1". Como la membrana es permeable al agua y a los iones K^+ y Cl^- , estos se moverán a través de la misma hasta alcanzar la condición de equilibrio, es decir, aquella en la que los flujos netos son nulos. Inicialmente no existirá Cl^- en "1", pero conforme transcurre el tiempo, este anión difundirá del compartimiento "2" al "1" acompañado por una cantidad igual de K^+ , de acuerdo con el principio de electroneutralidad, de tal manera que, al momento de alcanzarse el equilibrio ($t=\infty$) se cumplen las siguientes igualdades:

$$[\text{K}^+]_2 = [\text{Cl}^-]_2 \quad (1)$$

asimismo:

$$[K^+]_1 = [Cl^-]_1 + [A^-]_1 \tag{2}$$

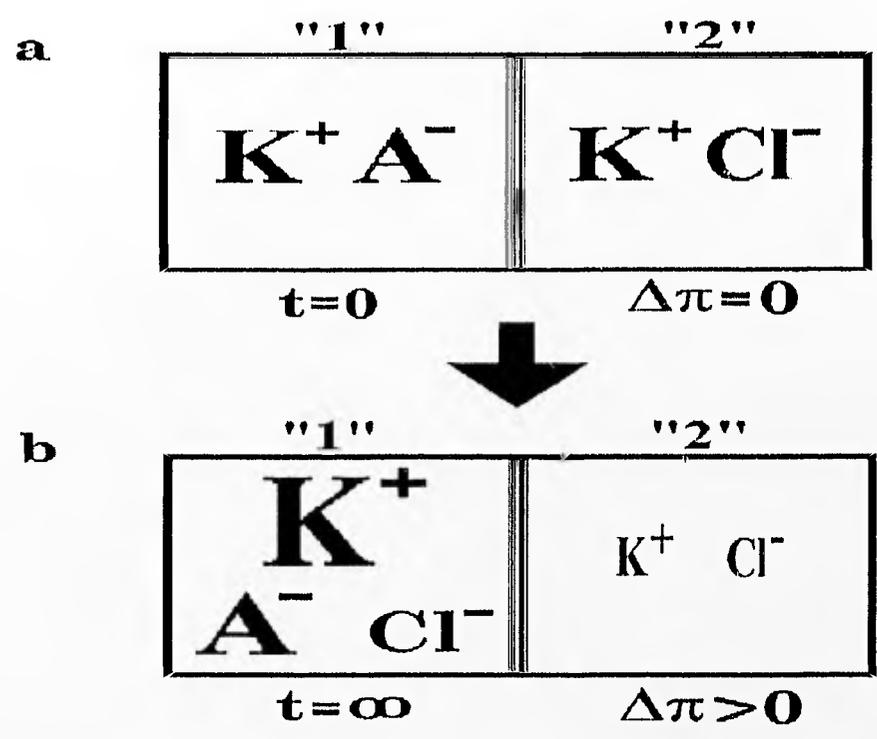


Figura 1. EQUILIBRIO DE GIBBS-DONNAN. En este esquema se ilustra la distribución de los iones en un sistema fisicoquímico integrado por dos compartimientos cerrados a la atmósfera y separados entre sí por una membrana permeable al agua, al K^+ y al Cl^- e impermeable al anión proteínico A^- . (a) Supongamos que al tiempo $t=0$, se añade al compartimiento "2" una solución de KCl y al compartimiento "1" una solución hecha con la sal potásica de una proteína (KA). Ambas soluciones poseen las mismas concentraciones, de modo que al $t=0$, no existe movimiento neto de iones a través de la membrana y por lo tanto no existe diferencia de presión osmótica a través de la misma, es decir, $\Delta\pi=0$. Conforme transcurre el tiempo, el agua y los iones difusibles K^+ y Cl^- se moverán a través de la membrana hasta alcanzar el estado de equilibrio. (b) El estado de equilibrio ($t=\infty$) se caracterizará por presentar una distribución asimétrica de los iones difusibles. Ahora el compartimiento "1" presenta una mayor concentración de iones (partículas osmóticamente activas), que generan un gradiente de presión coloidosmótico entre ambos compartimientos, es decir, $\Delta\pi>0$. Esta distribución se conoce como equilibrio de Gibbs-Donnan. Además, esta distribución asimétrica de los iones genera una diferencia de potencial eléctrico entre "1" y "2" (potencial de Donnan), siendo el compartimiento "1" negativo con respecto al "2".

La existencia de una distribución asimétrica de los iones difusibles a través de la membrana, dará lugar al establecimiento de una diferencia de potencial eléctrico a través de la misma. La magnitud de este potencial eléctrico puede ser descrito aplicando la ecuación de Nernst. Esta ecuación describe la magnitud del potencial eléctrico necesario para que el flujo neto de cada uno de los iones difusibles sea cero. Si aplicamos esta expresión para el caso particular del K^+ , tenemos que:

$$E_{K^+} = RT/zF \ln[K^+]_2/[K^+]_1 \quad (3)$$

donde E_{K^+} es la diferencia de potencial eléctrico al cual el flujo neto del ión K^+ a través de la membrana es cero. R , es la constante universal de los gases ($8.314 \text{ V}\cdot\text{C}/\text{K}\cdot\text{mol}$). T , es la temperatura absoluta ($^{\circ}\text{K}$). z corresponde al número de carga o valencia del ión. F , es la constante de Faraday (96487 C/mol).

Dado que en el sistema que estamos describiendo existe más de una especie de iones difusibles (ej. Cl^-), al momento de establecerse el equilibrio ($t = \infty$), el potencial a través de la membrana (E_m), conocido como **potencial de Donnan**, cumplirá con la siguiente igualdad:

$$E_m = RT/zF \ln[K^+]_2/[K^+]_1 = RT/zF \ln[\text{Cl}^-]_1/[\text{Cl}^-]_2 \quad (4)$$

Así, de la expresión 4 resulta que:

$$[K^+]_2/[K^+]_1 = [\text{Cl}^-]_1/[\text{Cl}^-]_2 \quad (5)$$

De esta manera, Gibbs y Donnan descubrieron que el equilibrio de un sistema similar al que estamos mostrando, se alcanza cuando el producto de las concentraciones de los iones difusibles en un compartimiento es igual al producto de las concentraciones de los iones difusibles en el otro compartimiento. Esta igualdad es conocida como la ecuación de Gibbs-Donnan:

$$[K^+]_1 \cdot [Cl^-]_1 = [K^+]_2 \cdot [Cl^-]_2 \quad (6)$$

Cuando el sistema alcanza el equilibrio tenemos que: $[K^+]_1 + [Cl^-]_1 > [K^+]_2 + [Cl^-]_2$. Considerando al anión no difusible (A^-), tenemos que: $[K^+]_1 + [Cl^-]_1 + [A^-]_1 > [K^+]_2 + [Cl^-]_2$. Esto quiere decir que, en el estado de equilibrio, la concentración de partículas osmóticamente activas en el compartimiento "1" es mayor que en el "2".

En suma, cuando el sistema que consideramos haya alcanzado el estado de equilibrio, de acuerdo con el principio de Gibbs-Donnan, presentará las siguientes características:

- 1) *Una distribución asimétrica de los iones difusibles entre los dos compartimientos como resultado de la presencia de los aniones (A^-) no difusibles.*
- 2) *Una diferencia de potencial eléctrico entre los dos compartimientos (potencial de Donnan).*
- 3) *Una diferencia de presión osmótica entre los dos compartimientos ($\Delta\pi > 0$), como resultado de que la concentración total de solutos osmóticamente activos en el compartimiento "1" es mayor que en el compartimiento "2".*

Dada la permeabilidad de la membrana al agua, la $\Delta\pi$ favorece el flujo neto del solvente hacia el compartimiento "1". Es decir, el agua tiende a moverse hacia el compartimiento donde

su concentración o actividad química es menor; sin embargo, debido a la rigidez de las paredes del sistema, no existe flujo neto de agua y por lo tanto no hay un aumento en el volumen del compartimiento "1". Por el contrario, si las paredes del compartimiento "1" fuesen distensibles como lo es la membrana plasmática de las células animales, entonces el flujo neto de agua produciría un incremento en el volumen de este compartimiento.

Los procesos físicoquímicos del sistema que hemos ejemplificado son muy similares a los que ocurren en las células animales. Las macromoléculas orgánicas con carga eléctrica negativa presentes en el citosol que no permean a través de la membrana plasmática, generan un gradiente de presión coloidosmótica dirigido hacia el interior celular. Considerando la alta distensibilidad de la membrana plasmática, el influjo osmótico de agua provocaría que la célula aumentara de volumen en un medio isosmótico, que incluso culminaría con la eventual citólisis. Es evidente que las células animales no se encuentran en equilibrio de Gibbs-Donnan.

1.5 Hipótesis de la "bomba y fuga"

Hemos visto que las células animales mantienen su volumen constante en condiciones fisiológicas. Además, los iones y el agua no están distribuidos de acuerdo con lo que predice el equilibrio de Gibbs-Donnan. Esto sugiere que la membrana plasmática debe poseer mecanismos de transporte activo que resultan en el eflujo de solutos, reduciendo el contenido de partículas osmóticamente activas en el compartimiento intracelular. Esta es justamente la idea central de la hipótesis de D. C. Tosteson y J. F. Hoffman, formulada en 1960. Esta hipótesis intenta explicar los mecanismos que previenen el hinchamiento coloidosmótico celular en condiciones fisiológicas (isosmóticas) es decir, los mecanismos de mantenimiento del volumen celular. De

acuerdo con dicha hipótesis la bomba de Na^+ es la responsable de esta función celular. De aquí que una de las predicciones de esta hipótesis es que si se inhibe a la bomba de Na^+ , (por ejemplo con ouabafina), las células se cargarán de Na^+ y de Cl^- con la consecuente entrada osmótica de agua seguida de un aumento del volumen celular. Esto es debido a que, como el gradiente electroquímico del Na^+ está dirigido hacia el interior celular, este catión se "fuga" hacia este compartimiento a través de sistemas de transporte electrodifusionales (canales) y sistemas de transporte activo secundario (cotransportadores e intercambiadores). En otras palabras, como el sistema que expelle activamente al Na^+ está inhibido, este ión "inundará" el interior celular. Paralelamente a la ganancia de Na^+ , se producirá una entrada neta de Cl^- debido a la despolarización de la membrana plasmática. La entrada de ambos iones se acompañará de la entrada osmótica de agua, lo cual resultará en un aumento del volumen celular dada la distensibilidad de la membrana plasmática.

1.6 La bomba de Na^+ (ATPasa de Na^+/K^+)

La ATPasa de Na^+/K^+ es una enzima que se encuentra en la membrana plasmática de todas las células animales. Esta proteína opera como un antiportador que "bombea" activamente 3 iones Na^+ hacia el exterior de la célula y 2 K^+ hacia el interior de la misma, por cada ciclo, en contra de los gradientes electroquímicos respectivos de estos iones. Esta operación se realiza de manera acoplada a la hidrólisis de una molécula de ATP (liberando ADP y fosfato inorgánico) por cada ciclo de la bomba.

Debido a que la bomba de Na^+ transporta tres cargas positivas hacia el exterior celular por cada dos que introduce, genera una corriente neta a través de la membrana, por lo que se

dice que es *electrogénica*. Esta electrogenicidad crea una diferencia de potencial eléctrico tal, que cuando se suspende la operación de la bomba, las células se despolarizan.

2 METODOLOGIA

2.1 Microelectrodos dobles selectivos a iones

La medición de las concentraciones intracelulares de los iones Na^+ y K^+ , así como la actividad intracelular de Cl^- , se llevó a cabo mediante microelectrodos dobles selectivos a iones, (MDSI). Estos microelectrodos se usan para medir tanto cambios como valores absolutos de las actividades de cualquier ión fisiológico intracelular (a_x^i), o extracelular (a_x^o) (Thomas, 1978; Syková et al., 1981; Ammann, 1986). Una de las ventajas más importante de los MDSI es que permiten la medición simultánea de las actividades iónicas y del potencial de membrana (E_m), en células individuales. Es importante enfatizar que los MDSI miden *actividades* iónicas y *no concentraciones* iónicas. Sin embargo, calibrados en soluciones de concentraciones iónicas conocidas, es posible expresar las medidas de actividad iónica en términos de concentraciones libres. Desde el punto de vista termodinámico, el parámetro relevante es la actividad de un ión en particular (a_x^i), o su concentración libre y no la concentración total, entendiéndose por ésta la fracción unida a proteínas, u otros ligandos intracelulares, además de la concentración libre.

Actualmente se pueden construir microelectrodos para la medición de las concentraciones libres de los iones inorgánicos de importancia fisiológica, tales como el Na^+ , K^+ , H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , y Cl^- , que se encuentran presentes en los líquidos intra- y extracelulares (ej., Alvarez-Leefmans, et al. 1990a; Alvarez-Leefmans, et al. 1986; Vaughan-Jones y Aickin, 1987; Alvarez-Leefmans, et al. 1994). Los MDSI también son útiles para medir cambios en el VCA en células

nerviosas individuales y células gliales, (Reuss, 1985; Ballanyi y Grafe, 1988; Alvarez-Leefmans, et al. 1992).

Actualmente, la mayoría de los MDSI utilizan una membrana líquida artificial como elemento sensor de iones. Las membranas líquidas para electrodos selectivos a iones forman una fase orgánica que separa a la solución acuosa (muestra) de la solución interna de llenado de los electrodos (fig. 2g). Con base en su composición, existen tres tipos de membranas líquidas, aquellas que contienen: a) un intercambiador iónico, b) un acarreador cargado o c) un acarreador neutro. Estos compuestos, también denominados ligandos, confieren la selectividad iónica a estas membranas. Los acarreadores neutros son los más ampliamente utilizados. Estos extraen selectivamente a los iones desde la fase acuosa de la muestra y los transportan a través de la barrera orgánica por translocación del acarreador (Anmann, 1986).

Cuando el ión a ser medido, es decir, el ión primario, es transferido selectivamente de la solución muestra hacia la fase de la membrana selectiva, se genera una diferencia de potencial eléctrico entre la solución interna del microelectrodo y la solución muestra. Este potencial eléctrico (E_{ISJ}), en respuesta al ión primario, i , en presencia de varios iones interferentes, j , k , ..., en la solución, se describe formalmente por la ecuación de Nicolsky-Eisenman (Nicolsky, 1937; Eisenman, 1967):

$$E_{\text{ISJ}} = E_0 + S \cdot \log [a_i + K_{ij}^{\text{POT}} \cdot (a_j)^{z_i/z_j} + K_{ik}^{\text{POT}} \cdot (a_k)^{z_i/z_k} \dots] \quad (7)$$

donde:

E_{ISJ} : es el potencial del electrodo selectivo a iones.

E_0 : es una diferencia de potencial constante que depende del electrodo de referencia y de la temperatura, que además involucra al potencial de unión líquida y al potencial del electrodo de referencia. Específicamente: $E_0 = E_I^0 + E_R + E_D$ donde:

E_I^0 : es una diferencia de potencial constante que incluye la diferencia de potencial de la interface entre la solución de llenado y la membrana artificial electroquímica.

E_R : es un potencial constante (independiente de los cambios en la composición de la solución muestra) que incluye la diferencia de potencial entre el conductor metálico (alambre de Ag:AgCl) y la solución interna de llenado del electrodo selectivo, y de la diferencia de potencial entre el electrolito de referencia (puente salino) y el alambre conductor de Ag:AgCl dentro del electrodo de referencia.

E_D : es la diferencia de potencial de unión líquida generada entre el electrolito de referencia (puente salino) y la solución muestra. Se debe tener presente que E_D puede cambiar con la composición de la solución muestra.

S : es la pendiente empírica de la respuesta del electrodo selectivo a iones. Su valor teórico es $2.303 (RT/z_i F)$. (También se define como $S = nRT/z_i F$ donde n es una constante empírica adimensional); de tal manera que esta expresión es la *pendiente* observada cuando el E_{pot} se ajusta a una función del $\ln [X^\pm]_i$ cuando $K_{ij}^{\text{pot}} \cdot a_j^{z_i/z_j} = 0$;

R, T, z y F ya han sido definidos.

a_i : es la actividad del ión primario i , expresado en moles por litro (M), en la solución muestra.

a_j, a_k : son las actividades de los iones interferentes j y k respectivamente.

z_j, z_k : son las valencias de los iones interferentes j y k respectivamente.

K_{ij}^{pot} : es el coeficiente de selectividad potenciométrica o simplemente coeficiente de selectividad. Es una medida de la preferencia de la membrana líquida por el ión interferente j , en relación con el ión primario i . En otras palabras, el coeficiente de selectividad indica la magnitud por la que un ión interferente j , modifica la respuesta del electrodo para el ión i , que es su ión primario. Por lo tanto, entre más pequeño sea el valor del coeficiente de selectividad, menor es la interferencia del ión j , respecto a la selectividad del electrodo por el ión primario i . Un electrodo ideal sería aquel cuyo K_{ij}^{pot} sea igual a cero. En este caso, la ecuación 7, se reduce simplemente a la ecuación de Nernst. De esta manera, el potencial del electrodo estaría dado por: $E_{MSI} = E_0 + S \cdot \log a_i$.

2.2 Elaboración de los microelectrodos selectivos a iones

Se utilizaron segmentos de capilares dobles de vidrio de borosilicato con filamento interno. Los capilares se sometieron a un proceso de limpieza mediante la reacción química que se produce al mezclar alcohol etílico con ácido nítrico. Se lavaron con agua corriente y se pusieron en ebullición con tres cambios de agua desionizada y finalmente se secaron en un horno. La figura 2 muestra el método utilizado para la elaboración de los MDSI: a) Se cortaron segmentos dobles de 9-10 cm de longitud (cada capilar con 1.0 mm d.e., y 0.43 mm d.i.; Hilgenberg, Malsfeld, FRG). b) Los capilares dobles se colocaron en un estirador horizontal de pipetas (PD-5, Narishige, Tokio, Japón), se les aplicó calor suficiente durante 30 s y se giraron 360°. Se suspendió el calentamiento por espacio de 30 s y se aplicó una fuerza de estiramiento.

Se obtuvieron un par de MDSI de las mismas dimensiones c). Ambos MDSI se pusieron en contacto con los vapores de silano durante 3-5 min d). *El proceso de silanización confiere carácter lipofílico a las paredes internas del vidrio capilar de los MDSI. Esto evita que el sensor, por ser hidrofóbico, sea desplazado por el agua de la solución electrolítica desde la superficie hidrofílica del vidrio. Durante la silanización los grupos OH-hidrofílicos de la superficie del vidrio se cubren por grupos lipofílicos presentes en las sustancias silanzantes* (Heinemann y Arens, 1992). Cada microelectrodo doble fué colocado con la punta hacia arriba sobre un cubo de aluminio precalentado en un horno a 250 °C, donde permanecieron por espacio de 2 h e). Se cortó una de las ramas del MDSI y se le colocó el sensor selectivo a la rama de mayor longitud, mientras que en la rama corta se colocó el intercambiador líquido de referencia (RLIX) para registrar el E_m f). Se colocaron las soluciones electrolíticas en su respectivo capilar g). Finalmente, para establecer contacto eléctrico con cada uno de los canales de los MDSI, se utilizaron alambres de plata (Medwire Company, E.U.A) de 5-8 cm de longitud h). Una vez terminados, los microelectrodos dobles estaban listos para ser usados o almacenados hasta por espacio de 1 mes en un ambiente seco.

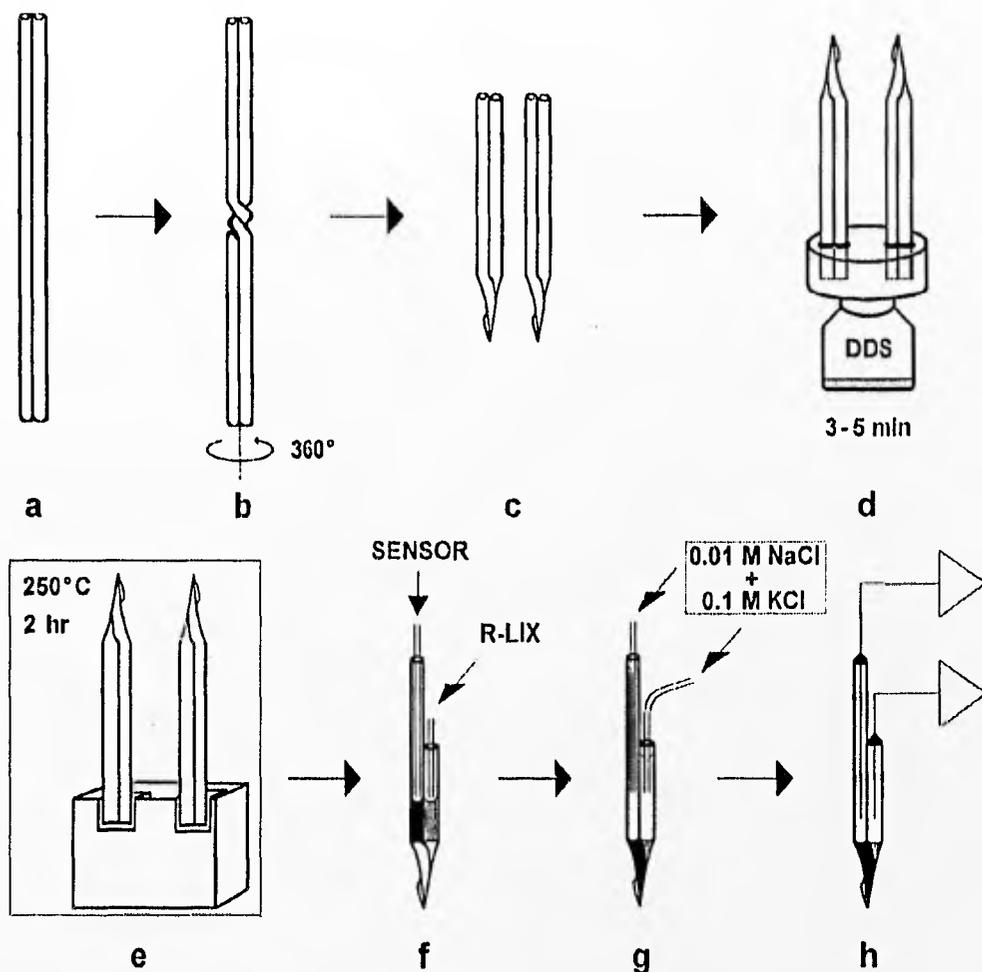


Figura 2. ELABORACION DE MICROELECTRODOS DOBLES SELECTIVOS A IONES (MDSI). (a) Capilar doble de vidrio de borosilicato (9-10 cm). (b) Rotación de 360° después de haber aplicado calor suficiente. (c) Se proporciona el impulso de estiramiento para dar origen a dos microelectrodos de las mismas dimensiones. (d) Se ponen en contacto con los vapores del silano (DDS), durante 3-5 min. (e) Los electrodos se colocan sobre una plataforma de aluminio y se introducen al horno a 250° C durante 2 h. (f) Se cortan 3-4 cm de uno de los capilares para diferenciar el electrodo de E_m (capilar corto) del electrodo selectivo a iones (E_{ESI}). Con una jeringa, se introduce la membrana selectiva o sensor, lo más próximo a la punta del electrodo selectivo, así como también se coloca el intercambiador iónico líquido de referencia (RLIX) para medir el E_m (capilar corto). El filamento interno de los capilares, al romper la tensión superficial del sensor, permitirá que este avance con mayor facilidad hasta la punta. (g) En cada capilar, detrás del sensor se coloca la solución electrolítica apropiada. (h) Se conectan a sus respectivos electrómetros.

Antes de ser conectados a los MDSI, los alambres de plata se cloruraron mediante electrólisis. La ventaja principal del clorurado es conferir estabilidad y reversibilidad en el potencial de los electrodos (Alvarez-Leefmans, 1992b). Para lograr el clorurado, se quita (1-2 cm) la cubierta de teflón de los extremos de un alambre de plata. La parte descubierta se limpia con etanol para remover cualquier residuo de grasa. El alambre se coloca en un recipiente conteniendo una solución de KCl 0.1 M y se conecta al polo positivo (ánodo) de una fuente de corriente, mientras que al polo negativo (cátodo), se conecta un alambre de plata que igualmente se pone en contacto con la solución del recipiente. La fuente de corriente utilizada fue una batería alcalina de 1.5 V conectada en serie a un potenciómetro. Para la cloruración se utilizó una densidad de corriente de 1-2.5 mA/cm², durante 20-30 min.

Una vez clorurados, los alambres se introdujeron a través del extremo terminal abierto de los dos capilares y ambos se sellaron con cera dental (Kerr, Ca, E.U.A.) para evitar la fuga de las soluciones electrolíticas. Después, los electrodos se conectaron a sus respectivas puntas de prueba para medir su resistencia eléctrica (*R*) de CD.

En la realización de los experimentos, se utilizó como electrodo de referencia extracelular un puente de agar de KCl 3M, con la finalidad de impedir la contaminación de la solución del baño por un flujo masivo de KCl. Los puentes de agar se elaboraron haciendo una solución 2-3% de agar en KCl 3M (2-3 g de agar en 100 ml de KCl 3M). La solución se puso a ebullición y se succionó con una jeringa al interior de tubos de polietileno de 1 mm de diámetro. Después de que el agar se enfrió, se cortaron los tubos en segmentos de 4-6 cm. El puente de agar se conectó a la tierra del circuito a través de una pastilla de Ag-AgCl.

Con el fin de obtener una R adecuada a los rangos de las resistencias de entrada de los amplificadores utilizados, los MDSI se biselaron con alúmina (0.05 micron gamma alúmina, Buehler, Micropolish) suspendida en agua desionizada. (El corte oblicuo y homogéneo de la punta de los microelectrodos provocado por la fricción con la alúmina, aumenta el área de sección de la punta, lo cual resulta en una disminución de la R). Una de las ventajas del biselado es que los electrodos se vuelven más estables, menos ruidosos eléctricamente y más afilados.

Se midió la R de los MDSI mientras permanecían en solución Ringer normal o solución fisiológica de caracol, (R_n). Para el caso del electrodo de referencia (E_m), la R se midió al pasar pulsos de corriente (DC) de 1 nA y fué de 30-60 M Ω ($n=36$). La R de los electrodos selectivos (E_{MDSI}) se midió al pasar pulsos de corriente (CD) de 1 pA y fué de 100-160 G Ω ($n=36$).

Para medir la $[Na^+]_i$ se utilizó un sensor de Na^+ conteniendo el acarreador neutral ETH-227 (Fluka, Buchs, Suiza). Detrás del sensor se colocó una solución 10 mM de NaCl y 100 mM de KCl. Para el registro del E_m el electrodo de referencia se llenó con una solución 3M de KCl.

Para medir la $[K^+]_i$ se utilizó el sensor de K^+ basado en el acarreador neutral valinomicina (Cocktail A, 60031; Fluka, Buchs, Suiza). Detrás del sensor se colocó una solución 10 mM de NaCl y 100 mM de KCl. Para medir E_m , en vez de KCl, se utilizó una solución 3M de LiCl para evitar la contaminación del citosol con K^+ . Para evaluar la posible existencia de un potencial de unión líquida generado en la punta de los electrodos llenos con la solución 3M de LiCl, en seis neuronas se midió el E_m simultáneamente con los dos capilares de un electrodo doble conteniendo una solución 3M de KCl en una de sus puntas, y en la otra, una solución 3M de LiCl. El valor promedio del E_m medido usando como electrólito al KCl, fue 0.7 ± 0.2 mV más negativo que el medido con la solución de LiCl. Por lo tanto, no fue necesario hacer

ninguna corrección del potencial de unión líquida a los valores de E_m medidos con la solución de LiCl.

Para el registro de la actividad de Cl^- , se utilizó el sensor (Mn(III)TPP, Fluka, Buchs, Suiza). Detrás del sensor se colocó una solución de la misma composición que la usada para los electrodos de Na^+ y K^+ . Para el registro del E_m se utilizó un intercambiador iónico líquido de referencia (R-LIX), con el objeto de evitar la contaminación del citosol con aniones inorgánicos (Thomas y Cohen, 1981; Alvarez-Leefmans, 1992b). Este sensor orgánico consiste de 2 % P/V de potasio tetrakis (*p-clorofenil*) borato, disuelto en 1-octanol. Debido a que el sensor muestra igual selectividad para el Na^+ y para el K^+ ; es crucial que la suma de las actividades de estos iones sea constante en todo momento, dentro y fuera de la célula.

2.3 Procedimiento de registro

En todos los experimentos, el E_{ESL} se registró a través de una de las puntas de prueba de un electrómetro (WPI FD-223, New Haven, CT, E.U.A.), de muy alta impedancia de entrada ($1 \times 10^{15} \Omega$). El E_m , (o E_{ref}), fue registrado con un electrómetro (WPI M-707, New Haven, CT, E.U.A.) de relativamente baja impedancia de entrada ($1 \times 10^{11} \Omega$). La señal del E_m se restó electrónicamente de la señal del E_{ESL} dando la señal diferencial ($E_{ESL} - E_m$), que es proporcional a la concentración del ión primario. En la figura 3 se ilustra el diagrama del sistema de registro.

La señal de salida procedente de los electrómetros fue filtrada a través de un filtro pasabajos (0-5.3 Hz.) y digitalizada mediante un convertidor analógico-digital (12 bits-Lab Master, Scientific Solutions Inc.). La adquisición de los datos se realizó en una computadora personal (MicroPlus) mediante el programa Asyst (Macmillan Software Co., E.U.A.). Cada canal fue

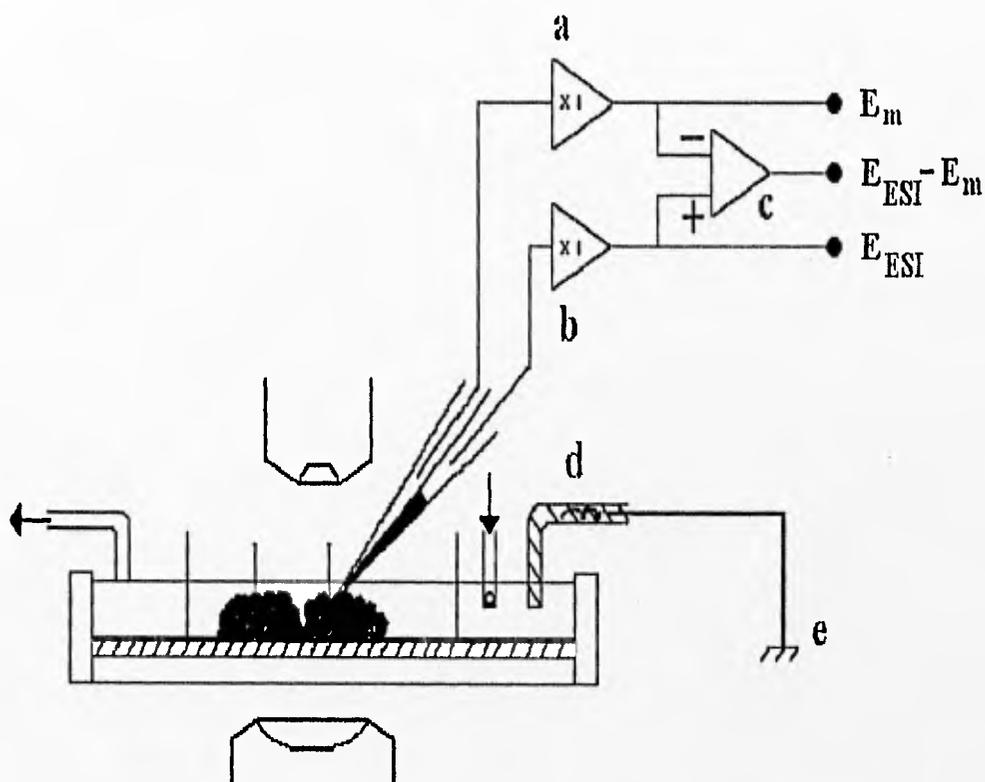


Figura 3. DIAGRAMA DEL SISTEMA DE REGISTRO. La penetración de la neurona con un MDSI permite registrar simultáneamente el E_m , potencial de transmembrana (a), así como el E_{ESI} , potencial del electrodo selectivo a iones, (b). Los registros de estos potenciales se logran a través de sondas electrómetros de ganancia unitaria. Para obtener el potencial diferencial, el cual es proporcional a la concentración del ión primario, se sustrae el valor del potencial que registra el electrodo de E_m del que registra el electrodo selectivo, es decir, $E_{ESI} - E_m$. La sustracción se realiza a través de un comparador de ganancia unitaria (c). El electrodo de referencia extracelular (puente de agar), (d), va conectado a la tierra del sistema, (e). Las flechas indican el punto de entrada y salida de la solución a la cámara de registro.

muestreado a 10 Hz. Paralelamente, las señales fueron registradas en un graficador de seis canales (Graphtech MC-6624). Cada experimento fue analizado posteriormente, utilizando los programas Sigma PLOT versión 5.0; TableCurve versión 3.1 (Jandel Scientific, E.U.A.) y Asyst, (Macmillan Software Co., E.U.A.).

2.4 Calibración de los MDSI de Na⁺, K⁺ y Cl⁻

Los MDSI se calibraron antes y después de cada penetración, en soluciones diseñadas para cada especie iónica a medir. La figura 4 muestra un ejemplo de calibración para un microelectrodo selectivo a Na⁺.

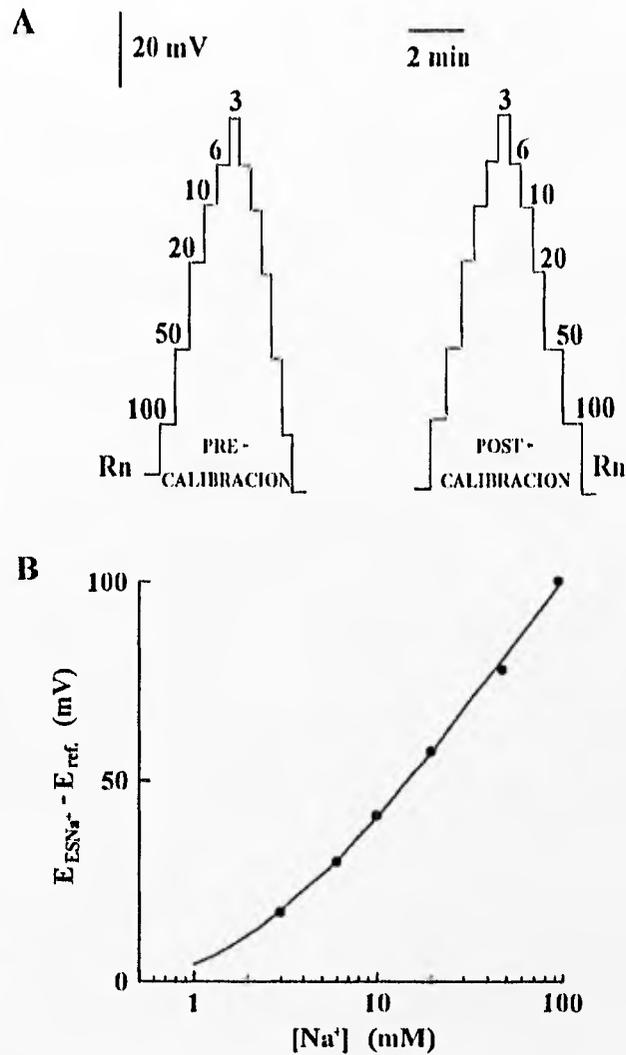


Figura 4. CALIBRACION DE UN MICROELECTRODO SELECTIVO A Na^+ . En (A) se ilustran los registros de la señal del potencial diferencial ($E_{ESNa^+} - E_{ref.}$), obtenida en varias soluciones de calibración y Rn antes de la penetración de la neurona (pre-calibración), y después de haber concluido el experimento (post-calibración). Los números indican la concentración de Na^+ (mM) de las diferentes soluciones utilizadas. (B) muestra la curva de calibración del potencial diferencial contra $[Na^+]$. La línea continua corresponde al mejor ajuste de la ecuación de Nikolsky-Eisenman por una regresión no lineal de mínimos cuadrados. Para el caso particular del Na^+ en la ecuación de Nikolsky: $E = E_0 + S \log([Na^+] + K_{NaK}^{POT} [K^+])$; donde E es el potencial del electrodo; E_0 , el potencial constante de referencia; S es el cambio de potencial del electrodo para un incremento de un orden de magnitud en la $[Na^+]$ y K_{NaK}^{POT} es el coeficiente de selectividad.

Las soluciones de calibración para los electrodos de Na^+ y K^+ , se elaboraron con mezclas de KCl y NaCl de concentraciones recíprocas de los iones primarios, manteniendo la fuerza iónica (I) constante (100mM). La I se calculó con la expresión: $I = 1/2 \sum c_i z_i^2$, donde c_i es la concentración del ión i y z_i^2 la valencia del ión i elevada al cuadrado. Las soluciones de calibración de Na^+ tuvieron las siguientes $[\text{Na}^+]$ en mM: 100, 50, 20, 10, 6 y 3. Así, por ejemplo, la de 100 mM Na^+ tenía únicamente 100 mM de NaCl, mientras que la 50 mM Na^+ , tenía 50 mM NaCl y 50 mM de KCl, y la de 20 mM Na^+ tenía 20 mM NaCl más 80 mM KCl, de tal manera que la I , como hemos mencionado, fuese constante. Para calibrar los electrodos de K^+ se procedió de manera análoga. De hecho se utilizaron las mismas soluciones que para el Na^+ . Quiere decir que para los casos del Na^+ y K^+ , las mediciones se expresaron en *concentraciones* de los iones primarios correspondientes.

Las soluciones de calibración de los microelectrodos selectivos al Cl^- , consistieron en soluciones "puras" de KCl, conteniendo actividades conocidas de este anión. Por lo tanto, en estas últimas soluciones la I varió. Para obtener la actividad de Cl^- (a_{Cl^-}), fué necesario multiplicar cada una de las concentraciones por su respectivo coeficiente de actividad (γ), de acuerdo con las tablas de Parsons, 1959. Por ejemplo, una solución 100 mM de KCl tendrá una actividad de Cl^- de 77 mM dado que $\gamma = 0.77$. Las soluciones de calibración de Cl^- tuvieron los siguientes valores de concentración y actividad respectivas (en mM): (150-110.85), (100-77.0), (50-40.8), (20-17.38), (10-9.02); (5-4.63) y (1-0.965). Quiere decir que las medidas de Cl^- , se expresaron en *actividades*.

Para un cambio en la concentración de las soluciones de calibración de Na^+ y K^+ de entre 10 y 100 mM, las pendientes de las curvas de calibración oscilaron entre 55-65

mV/log[Na⁺] y 51-57 mV/log[K⁺] respectivamente. Para el caso del Cl⁻, un cambio en la a_{Cl⁻} de entre 10 y 100 mM proporcionó una pendiente de 48-52 mV/log a_{Cl⁻}. La ecuación de Nikolsky-Eisenman se ajustó a los puntos de calibración obtenidos para cada electrodo mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados, utilizando el programa ELCAL (Barolet, Andrews y Morris, 1989). Los resultados fueron expresados como concentraciones iónicas para el caso del Na⁺ y del K⁺ y en actividades para el caso del Cl⁻, como ya se mencionó.

En todos los experimentos, los valores de las concentraciones y de las actividades de los iones medidos, se obtuvieron por interpolación en su respectiva curva de calibración.

2.5 Material biológico

Los experimentos del presente estudio se realizaron a temperatura ambiente (20-25 °C) en las células 1, 2, 76 y 77 del ganglio subesofágico parietal derecho de *H. aspersa* (Kerkut et al. 1975). En la figura 5 se muestra un esquema de este sistema ganglionar, así como la posición relativa del ganglio parietal derecho (F) dentro del anillo ganglionar subesofágico de este molusco.

El ganglio cerebroide de *H. aspersa* presenta enormes ventajas para el estudio de las propiedades electrofisiológicas y neurofarmacológicas de las neuronas. La posición anatómica estereotipada que estas neuronas guardan dentro de cada ganglio, su actividad eléctrica característica, así como las respuestas a la estimulación de los nervios periféricos principales y a la aplicación de determinadas drogas, hacen posible la identificación unívoca de células nerviosas específicas en cada ganglio, de una preparación a otra (Kerkut, et al. 1975). Además de su posición anatómica, las propiedades y las conexiones de cada célula nerviosa se mantienen

relativamente constantes a través de toda la vida de un animal adulto. Más aún, la forma casi esférica de los somas neuronales y su gran tamaño (150-200 μm) hacen de estas neuronas una preparación ideal para el registro intracelular con 2 o más microelectrodos, permitiendo el estudio correlativo de 2 o más variables biológicas (p. ej. el potencial de membrana y la concentración de un ión determinado). Otra ventaja de estas neuronas es que poseen mecanismos de transporte de iones a través de la membrana plasmática, tanto primarios, es decir que toman directamente la energía almacenada en el ATP (p. ej. la bomba de Na^+); como secundarios, es decir, sistemas que utilizan la energía almacenada en el gradiente de un ión sin consumo directo de energía derivada del ATP (p. ej. el intercambiador Na^+/H^+ que utiliza la energía almacenada en el gradiente de Na^+ , mismo que es generado y mantenido por la acción de la bomba de Na^+). Estas neuronas también presentan canales iónicos similares a los que se encuentran en neuronas de vertebrados superiores. Lo mismo puede decirse de algunos neurotransmisores cuyas respuestas fisiológicas son similares a las que se encuentran en el sistema nervioso de animales superiores incluyendo al hombre (Kandel, 1980; Hille, 1992; Ortells y Lunt, 1995).

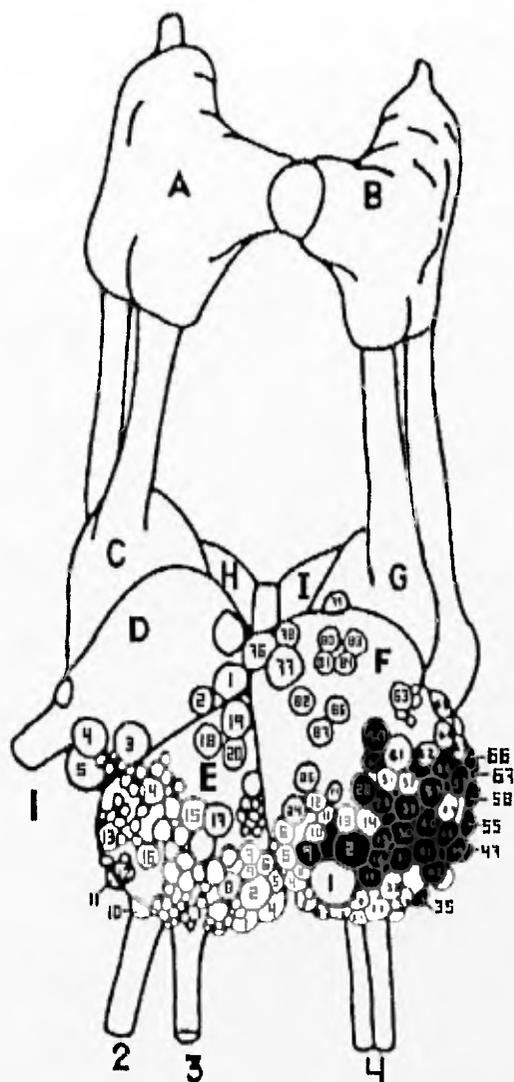
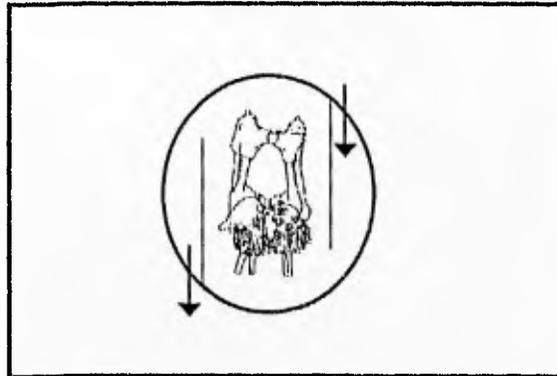


Figura 5. GANGLIOS NERVIOSOS DEL CARACOL TERRESTRE *Helix aspersa*. En este esquema modificado de Kerkut, et al. 1975, se ilustran los diferentes ganglios (indicados por letras) que constituyen el anillo anclonar subesofágico. Los somas neuronales están señalados con números pequeños y con números grandes se indican los nervios conectivos. Los experimentos del presente trabajo se realizaron en las neuronas 1, 2, 76 y 77 del ganglio parietal derecho (F).

2.6 Preparación del material biológico

Los caracoles adultos fueron colectados y depositados en cajas de plástico. Se alimentaron dos veces por semana con lechuga fresca. Para la obtención de la masa ganglionar, primero se despojó al caracol de su concha, la cual se cortó siguiendo el contorno de la espiral. El organismo desprovisto de su concha, se fijó ventralmente con alfileres a una plataforma de corcho. Se realizó un corte sagital del tejido epidérmico en dirección céfalo-caudal dejando expuesta la membrana serosa que cubre los órganos internos. Esta membrana se cortó sagitalmente rechazando sus extremos hacia los lados. Justo sobre la masa ganglionar se cortó el esófago, evitando derramar su contenido sobre el tejido nervioso. Finalmente, se extrajo la masa ganglionar que se depositó en una cámara de microdissección conteniendo Rn. El ganglio se fijó a través de sus nervios con agujas finas (minucias) al piso flexible de esta cámara constituido por un polímero inerte ("sylgard" Down Corning Corporation, E.U.A.). Finalmente, para facilitar la remoción de la cápsula delgada de tejido conectivo que se encuentra estrechamente adosada a los somas neuronales, se expuso el ganglio en una solución de proteasa tipo XIV (Sigma, E.U.A) a una concentración de 1 mg/ml de Rn durante 8 a 10 minutos. Una vez disecado, el ganglio fue transferido a una cámara circular de registro intracelular de volumen 0.8-1 ml. Esta cámara está constituida también por un piso de "sylgard", además de 2 divisiones de vidrio que facilitan la dirección adecuada del flujo de las soluciones de perfusión (fig. 6).

Figura 6. CAMARA DE REGISTRO INTRACELULAR. Consiste en una caja de Petri con piso de "Sylgard" (vol. 0.8-1 ml) unida a un portaobjetos. La preparación se coloca en el centro de la cámara y se fija con pequeñas "minucias" de acero al piso de ésta. Las divisiones de vidrio sirven para dirigir el flujo de las soluciones de perfusión y conseguir un recambio uniforme. Las flechas indican la circulación de las soluciones de perfusión. La tasa de circulación fue de 5 ml/min.



Las soluciones utilizadas en los experimentos se hicieron circular a través de la cámara a una tasa de 5 ml/min. Antes de la penetración intracelular, el diámetro de cada célula se midió con una reglilla colocada en el ocular de un microscopio óptico (Nikon Optiphot, Japón). Estas medidas fueron utilizadas para calcular, el área y el volumen celular considerando un soma neuronal esférico y suponiendo que la membrana plasmática no presenta invaginaciones o plegamientos. Considerando los parámetros morfométricos mencionados y la derivada de la concentración del ión "x" con respecto al tiempo ($d[x^{\pm}]/dt$), fue posible calcular los flujos iónicos netos por unidad de área de membrana plasmática de cada célula.

2.7 Soluciones experimentales

En la elaboración de las soluciones experimentales se utilizó agua desionizada. El proceso de desionización se logró mediante un sistema de resinas de intercambio iónico "Milli-Q" (Water Purification System, Millipore, E.U.A.). El agua utilizada tuvo una resistividad de 18 M Ω ·cm. El Rn tuvo la siguiente composición (en mM): 82.5 NaCl (Merck, México); 4 KCl (Merck,

México); 7 CaCl₂ (Sigma, E.U.A.); 5 MgCl₂ (J.T. Baker, México); 5 HEPES (Acido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico, Sigma, E.U.A.) y 5 Glucosa (Sigma, E.U.A.). El pH de las soluciones se ajustó a 7.5 con NaOH 1 M. Cuando así lo requería el experimento, al Rn se le adicionó la ouabaina ("G-Estrofantina", Sigma, E.U.A.) a una concentración final de 1 mM. Otras modificaciones realizadas al Rn consistieron en adicionar amilorida (Sigma, E.U.A.) o tetrodotoxina (Sankio Company Limited, Tokio, Japón) para obtener una concentración final de 1 mM y 10 µM respectivamente. En otros experimentos se agregó al Rn ácido propiónico (Sigma, E.U.A.) a una concentración de 20 mM.

3 RESULTADOS

3.1 Aumento en la concentración intracelular de Na⁺ al inhibir la bomba de Na⁺: flujo neto de Na⁺

Para evaluar si el aumento transitorio inicial en el VCA, que algunas veces se presenta en las neuronas de *H. aspersa* al inhibir la bomba de Na⁺, se debe a un incremento en la [Na⁺]_i, se estimó la $d[\text{Na}^+]_i/dt$, durante la inhibición selectiva de la bomba. Si consideramos que en el estado de reposo, el flujo neto de Na⁺ a través de la membrana plasmática es cercano a cero, es decir, el influjo es igual al eflujo, entonces, si se inhibe la bomba de Na⁺ se esperaría un incremento en la [Na⁺]_i por una reducción significativa en el eflujo. En la figura 7 se muestra el efecto de 1 mM de ouabaina sobre la [Na⁺]_i y el E_m registrados simultáneamente en una célula IF. La inhibición de la bomba de Na⁺ resultó en un incremento en la [Na⁺]_i, en este caso, con una tasa inicial de 1.03 mM/min (Fig. 7A). El incremento en la [Na⁺]_i mostró un curso temporal exponencial, con una sola constante de tiempo. El E_m registrado simultáneamente, mostró una

marcada despolarización, predecible por el carácter electrogénico de la bomba de Na^+ (Thomas, 1969). A esta despolarización de la membrana, siguió una hiperpolarización también pronunciada, que es debida a una corriente de K^+ activada por un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que también ocurre al inhibir la bomba de Na^+ (Alvarez-Leefmans, et al. 1994).

La $[\text{Na}^+]_i$ y el E_m en reposo ($t=0$), medidos en Rn en 27 células, fué de 6.17 ± 0.62 mM (rango: 2.53 - 14.25); y -55.53 ± 1.93 mV (rango: -36.4 a -72.0) respectivamente. En la misma muestra de células, después de la inhibición de la bomba de Na^+ , se observó un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$. En el 70 % de las células, (19 de 27), el curso temporal del incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ se ajustó con una función exponencial simple del tipo: $f(x) = a(1 - e^{-bx}) + c$.

En el restante 30 % de las células, (8 de 27), los primeros 10 minutos del incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ se ajustaron con una regresión lineal por mínimos cuadrados. El valor de la $d[\text{Na}^+]_i/dt$ del total de las células fué de 0.42 ± 0.05 mM/min (rango: 0.05-1.16; $n=27$). En todas las células se observó una marcada despolarización del E_m muchas veces seguida de una hiperpolarización. No se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos celulares aún cuando mostraban diferente actividad bioeléctrica espontánea.

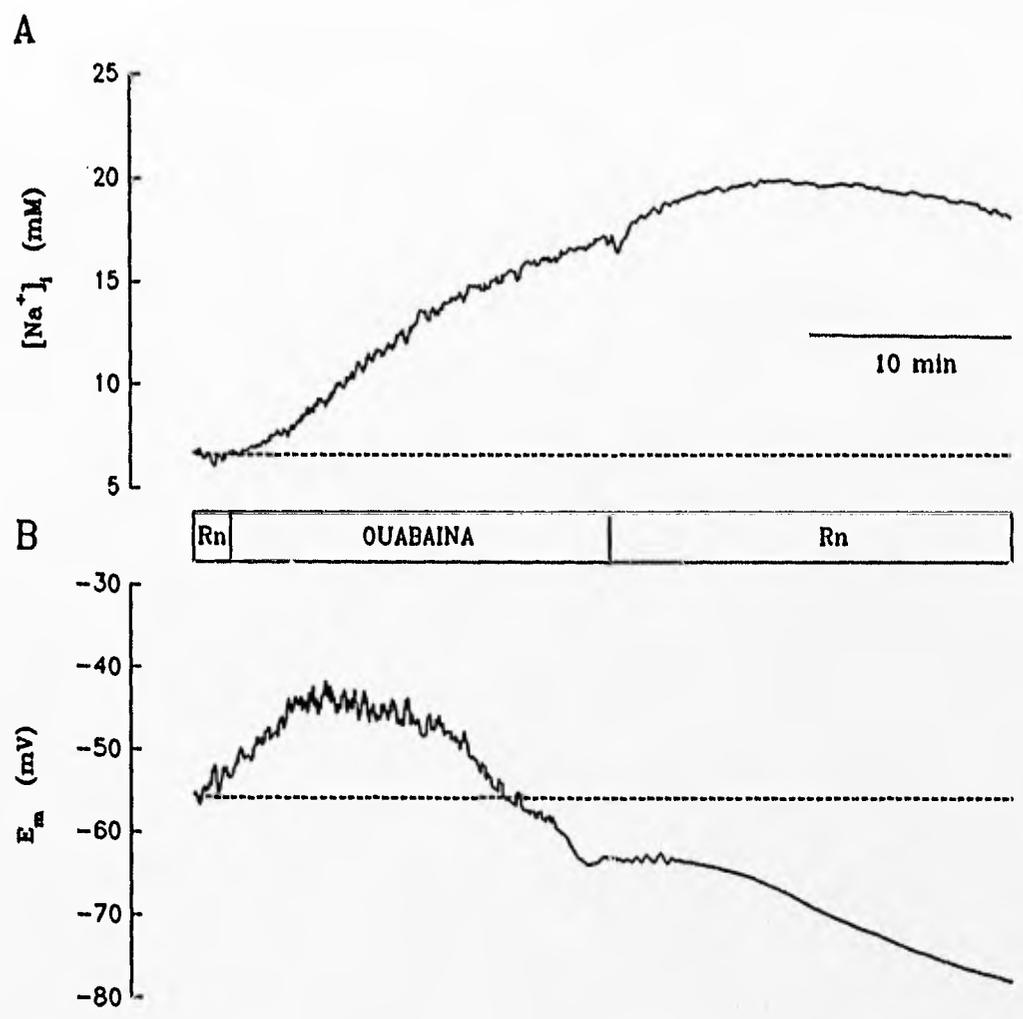


Figura 7. EFECTO DE LA OUABAINA SOBRE LA $[Na^+]_i$, Y EL E_m , EN UNA NEURONA 1F. (A) Registro de la $[Na^+]_i$. (B) Potencial de membrana, E_m . La barra indica el tiempo de aplicación de la ouabaina (1 mM). Nótese que al inhibir la bomba de sodio, la concentración intracelular libre de este catión aumenta. El análisis de este trazo mostró que este aumento en la $[Na^+]_i$ sigue un curso exponencial simple.

Para estimar el flujo neto de Na^+ (Φ_{Na^+} ; pmoles/cm²·s), es decir, la cantidad neta de Na^+ transportada a través de la membrana plasmática por unidad de área de la misma y por unidad de tiempo; se utilizó el área de la membrana plasmática calculada a partir del diámetro celular. Se aplicó la siguiente expresión:

$$\Phi_{\text{Na}^+} = h \cdot d[\text{Na}^+]_i/dt \quad (8)$$

Donde h es el cociente volumen/área de la célula (cm) y $d[\text{Na}^+]_i/dt$ (mM/min) ya fue definida. En la ecuación 8 se utilizó el valor de 0.42 ± 0.08 mM/min que representa la $d[\text{Na}^+]_i/dt$ de 13 células a las que se les midió el diámetro. Este valor no difiere de 0.42 ± 0.05 mM/min, que representa el valor del total de la población ($n=27$). El valor de Φ_{Na^+} fué de 15.7 ± 2.8 pmoles/cm²·s.

3.2 Efecto de la inhibición de la bomba de Na^+ sobre la $[\text{K}^+]_i$

Para evaluar la respuesta más frecuentemente encontrada en estas neuronas, consistente en una disminución del VCA ante la inhibición de la bomba de Na^+ (Alvarez-Leefmans, Gamiño y Reuss, 1992), fue necesario estudiar el efecto de la ouabaina sobre la $[\text{K}^+]_i$ por dos razones: a) es el catión intracelular más abundante y, b) su gradiente electroquímico está dirigido hacia el exterior celular. En la figura 8 se ilustra el efecto de la ouabaina sobre la $[\text{K}^+]_i$ y el E_m en una neurona 1F. En A se observa que al aplicar la ouabaina se produce una marcada disminución en la $[\text{K}^+]_i$ a una tasa inicial de 1.75 mM/min; mientras que en B, el E_m , presenta en este caso, una prominente despolarización que se mantuvo durante la aplicación del fármaco.

En estos experimentos, los primeros 10 minutos del registro de la fase de caída del K^+ se ajustaron con una regresión lineal por mínimos cuadrados. Después de la inhibición de la bomba de Na^+ en 9 células, la $[K^+]_i$ disminuyó con una tasa inicial de 1.4 ± 0.2 mM/min a partir de su nivel basal de 95 ± 9 mM. La $[K^+]_i$ comenzó a descender 2.7 ± 0.6 min después de administrar la ouabaina. El valor del eflujo neto de K^+ (Φ_{K^+}), fué de 61.5 ± 11.3 pmoles/cm²·s (rango: 22.4-109.0; n=9).

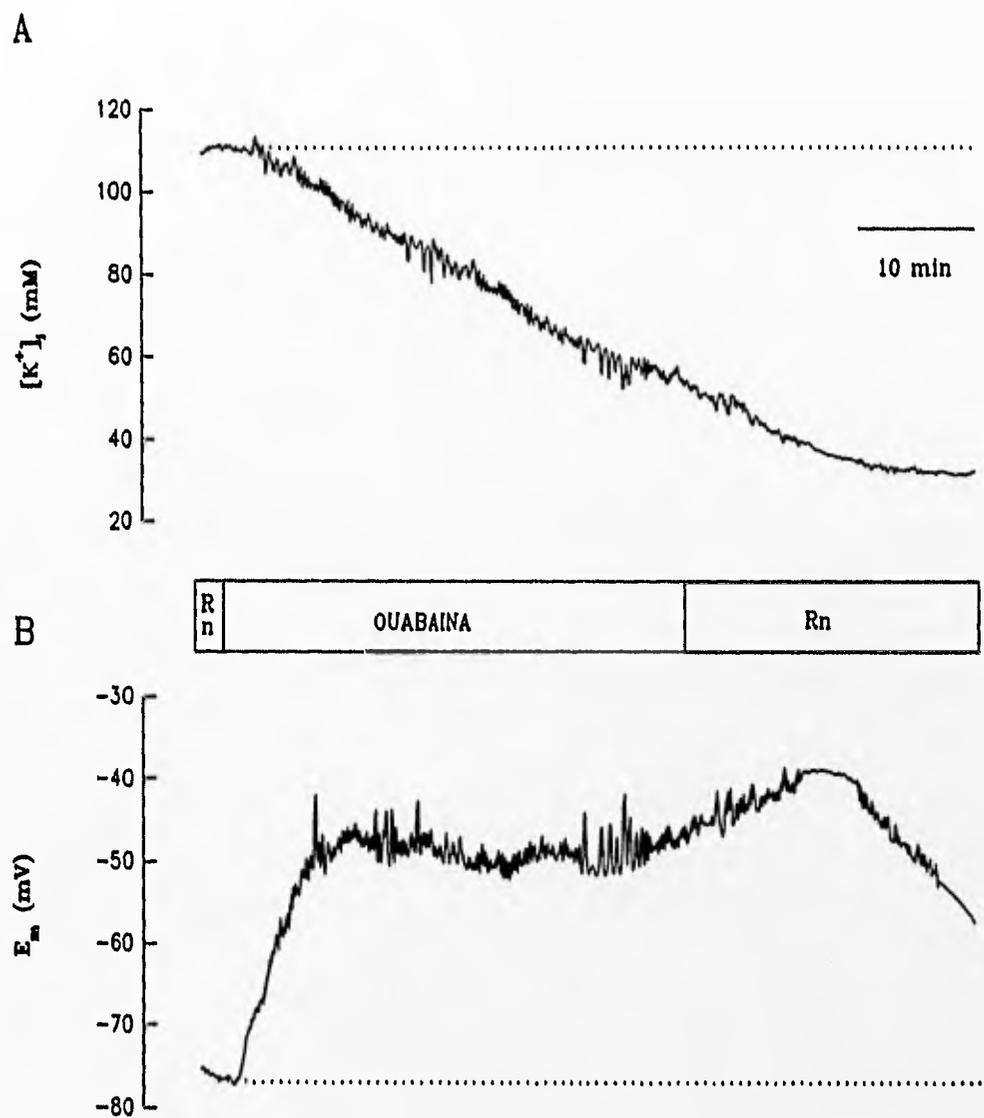


Figura 8. EFECTO DE LA OUABAINA SOBRE LA $[K^+]_i$ Y EL E_m EN UNA NEURONA 1F. A ilustra la disminución en la $[K^+]_i$ a una tasa inicial de 1.75 mM/min al aplicar la ouabaina. B muestra una prominente despolarización del E_m , la cual se mantiene durante la aplicación del fármaco.

3.3 Efecto de la ouabaína sobre la a_{Cl}^i .

Para determinar si el anión que acompaña al K^+ en su salida de la célula es el Cl^- , se midieron los cambios en la a_{Cl}^i producidos al inhibir la bomba de Na^+ . En trabajos previos se ha postulado que el potencial de equilibrio del Cl^- (E_{Cl}) es más positivo que el E_m , lo cual favorecería el flujo de Cl^- . Contrario a lo esperado, la a_{Cl}^i se incrementó con una $d a_{Cl}^i/dt$ de 0.030 ± 0.006 mM/min (rango: 0.01-0.06; $n=7$). Este incremento se produjo a partir de una a_{Cl}^i basal de 3.66 ± 0.48 mM/min (rango: 2.03-5.94; $n=7$). El valor de Φ_{Cl} estimado a partir de la $d a_{Cl}^i/dt$, fue de 1.47 ± 0.26 pmoles/cm²·s (rango: 0.45-2.65; $n=7$). En estas neuronas, los cálculos del E_{Cl} indican que es 13.6 mV más negativo que el E_m ($n=33$) (Alvarez-Leefmans, Márquez-Baltazar y Nani; observaciones no publicadas), contrario a lo que se había postulado desde hace más de dos décadas (véase revisión de Alvarez-Leefmans, 1990b). Por lo tanto, al tener el Cl^- un gradiente electroquímico dirigido hacia el *interior* celular, no puede ser el anión que acompañe al K^+ cuando se inhibe la bomba de Na^+ . La figura 9 muestra el efecto de la ouabaína sobre la a_{Cl}^i y el E_m en una célula 1F. En **A**, la ouabaína produjo un incremento en la a_{Cl}^i ; mientras que en **B**, el E_m mostró una despolarización seguida de una hiperpolarización.

En la tabla 1 se resumen los valores medidos de las concentraciones basales ($t=0$) de Na^+ , K^+ y Cl^- medidos en Rn. En la tabla 2 se resumen las tasas iniciales de cambio, ($d[X^\pm]/dt$), de los diferentes iones en presencia de la inhibición de la bomba de Na^+ . En la tabla 3 se resumen los valores calculados de los flujos netos correspondientes.

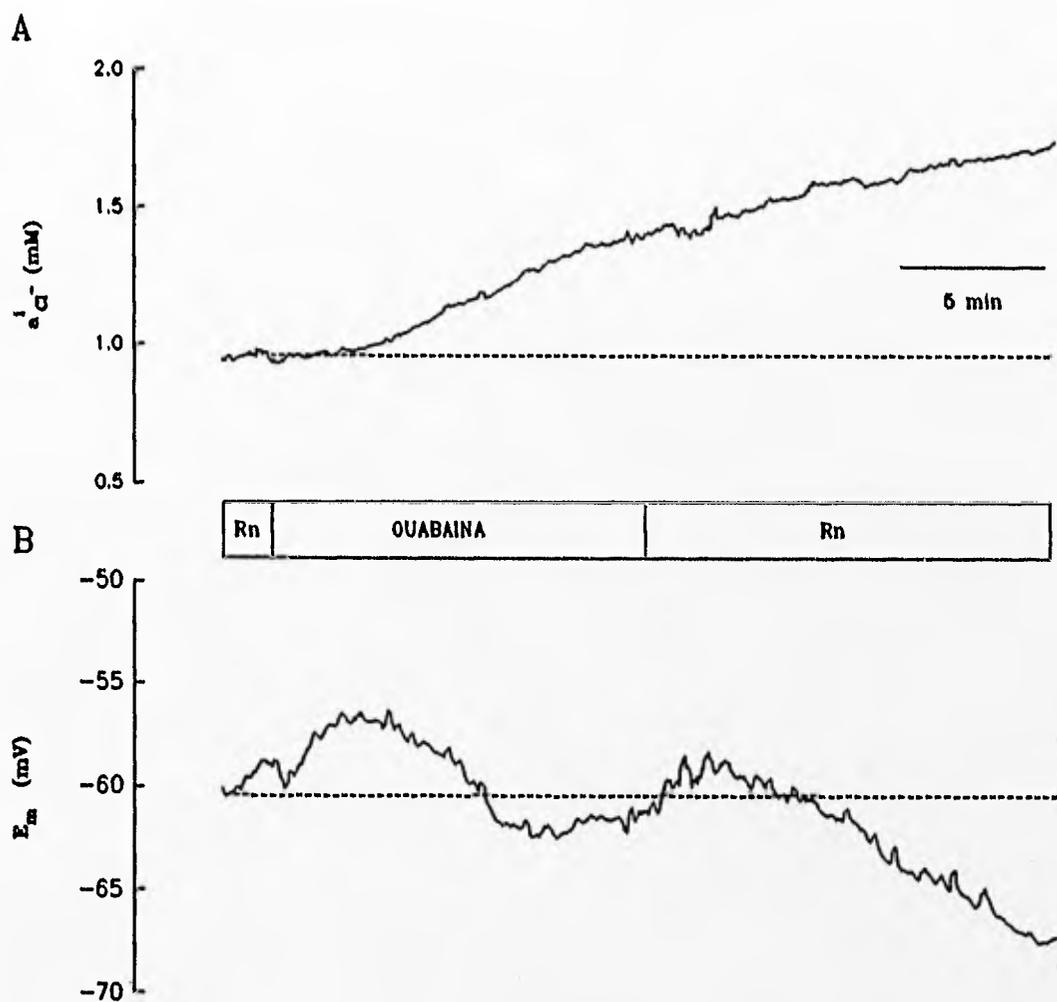


Figura 9. EFECTO DE LA OUABAINA SOBRE LA a_{Cl}^i Y EL E_m EN UNA CELULA 1F. En este registro se muestra que la aplicación de la ouabaina produce un incremento en la a_{Cl}^i a una tasa inicial de 0.04 mM/min (A). Por su parte, el E_m muestra una despolarización seguida de una hiperpolarización en presencia de la inhibición de la bomba de Na^+ (B).

Tabla 1. Valores basales ($t=0$), de $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$ y a_{Cl}^i , obtenidas en Rn; número de experimentos, (n), y rango.

Rn ($t=0$)	Na^+	K^+	Cl^-
$[X^+]_i$ y a_{Cl}^i (mM)	6.17 ± 0.62	95 ± 9.0	3.66 ± 0.48
n	27	9	7
Rango	2.53 - 14.25	71.5 - 146.0	2.03 - 9.94

Los valores representan la media \pm el error estándar. $[X^+]_i$ representa la concentración intracelular de Na^+ y K^+ .

Tabla 2. Valores de $d[Na^+]_i/dt$, $d[K^+]_i/dt$ y da_{Cl}^i/dt durante la inhibición de la bomba de Na^+ ; número de experimentos, (n), y rango.

Ouabafina	Na^+	K^+	Cl^-
$d[X^+]_i/dt$ y da_{Cl}^i/dt (mM/min)	0.42 ± 0.05	1.41 ± 0.25	0.030 ± 0.006
n	27	9	7
Rango	0.05 - 1.16	0.51 - 2.15	0.01 - 0.06

Los valores representan la media \pm el error estándar. La $d[X^+]_i/dt$ representa el valor de la tasa inicial de cambio en la concentración de Na^+ y K^+ , durante la inhibición de la bomba de Na^+ .

Tabla 3. Valores de los flujos netos de Na⁺, K⁺ y Cl⁻, (Φ_{Na^+} , Φ_{K^+} y Φ_{Cl^-}), durante la inhibición de la bomba de Na⁺.

Ouabafina	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
$\Phi_{x\pm}$ (pmoles/cm ² /s)	15.7 ± 2.8	61.5 ± 11.3	1.47 ± 0.26
n	13	9	7
Rango	5.3 - 43.3	22.4 ± 109.0	0.45 - 2.65

Los valores representan la media ± el error estándar de la media. $\Phi_{x\pm}$ representa el flujo neto de cada ión.

Con el objeto de identificar las posibles vías de entrada de Na⁺ hacia el citosol durante la inhibición de la bomba de Na⁺, así como en el estado de reposo, se realizaron los experimentos que se describen a continuación. Se exploraron dos posibilidades: a) que el Na⁺ entre por una vía sensible a la amilorida (sec. 3.4); y b) que el Na⁺ entre vía canales de Na⁺ voltaje-dependientes bloqueables por tetrodotoxina (TTX), (sec. 3.5).

3.4 Efecto de la amilorida y del ácido propiónico sobre la [Na⁺]_i

Una de las vías a través de la cual el Na⁺ puede ser transportado hacia el interior celular, es el intercambiador Na⁺/H⁺. Esta proteína utiliza la energía almacenada en el gradiente de Na⁺ para expulsar protones (H⁺) producto del metabolismo de la célula, por lo que es crucial para la regulación del pH intracelular (pH_i). Este contratransportador funciona acoplado el influjo de 1 Na⁺ con el eflujo de 1 H⁺, por lo que es electroneutro (Grinstein, 1988; Alberts, et al.

1994). Además de su función como regulador de pH_i , el intercambiador Na^+/H^+ juega un papel importante en el control del volumen celular (Seo, et al. 1995).

Para demostrar en las neuronas de *H. aspersa* la posible participación del intercambiador Na^+/H^+ como mecanismo implicado en el influjo neto de Na^+ , se estudió el efecto de la amilorida (1 mM) sobre la $[\text{Na}^+]_i$ durante la inhibición de la bomba de Na^+ , así como en el estado de reposo. La amilorida es un fármaco que inhibe de manera reversible, aunque no exclusiva, al intercambiador Na^+/H^+ (Warnock, et al. 1987; Seo, et al. 1995). Además, con el objeto de estimular la actividad del intercambiador, se estudió el efecto del ácido propiónico (20 mM) sobre la $[\text{Na}^+]_i$. Es importante mencionar que en trabajos previos se ha negado la presencia de este transportador en neuronas de *H. aspersa* (Thomas, 1984).

En la evaluación del efecto de la amilorida sobre la $[\text{Na}^+]_i$, se utilizaron dos protocolos: 1) se aplicó la amilorida durante la inhibición de la bomba de Na^+ aproximadamente una hora después de haberse producido el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$; 2) se aplicó el fármaco una y otra vez durante el estado de reposo.

En los experimentos donde se siguió el protocolo 1, la aplicación de amilorida produjo un cambio en la $d[\text{Na}^+]_i/dt$ respecto a la tasa control. Este cambio en la $d[\text{Na}^+]_i/dt$ revirtió cuando el fármaco fue removido de la solución del baño, durante la inhibición continua de la bomba de Na^+ (fig. 10A). El cambio en la pendiente fue más notable cuando la amilorida fue removida, como se observa en el inserto de la figura 10. Por otra parte, siguiendo el protocolo 2, la amilorida produjo una disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ que no sólo revirtió, sino que rebotó al remover el fármaco (fig. 11A). Estos resultados demuestran que parte de la permeabilidad al Na^+ en reposo de estas células es debida a la presencia de una vía sensible a la amilorida.

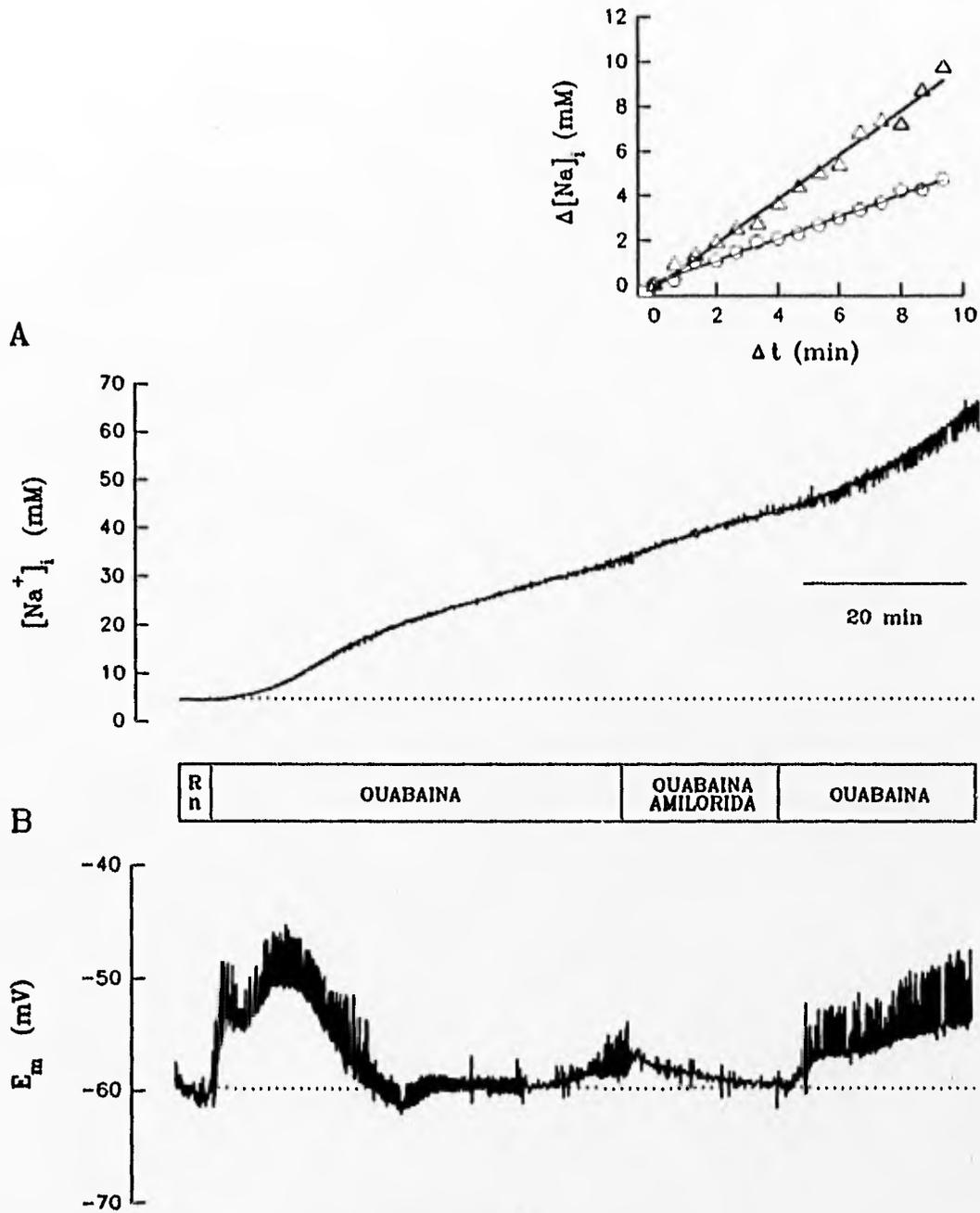


Figura 10. EFECTO DE LA AMILORIDA SOBRE LA $[Na^+]_i$ Y EL E_m DURANTE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ . Registro en una neurona 77F. (A) Nótese que el cambio en la $d[Na^+]_i/dt$ producido por la amilorida es notable cuando ésta es removida de la solución del baño durante la inhibición continua de la bomba de Na^+ . En el inserto de la parte superior derecha se muestra el cambio relativo en la $[Na^+]_i$ que producen la amilorida (círculos), y la remoción del fármaco (triángulos). (B) La remoción del fármaco produjo una segunda despolarización en el E_m en presencia continua de la ouabaina.

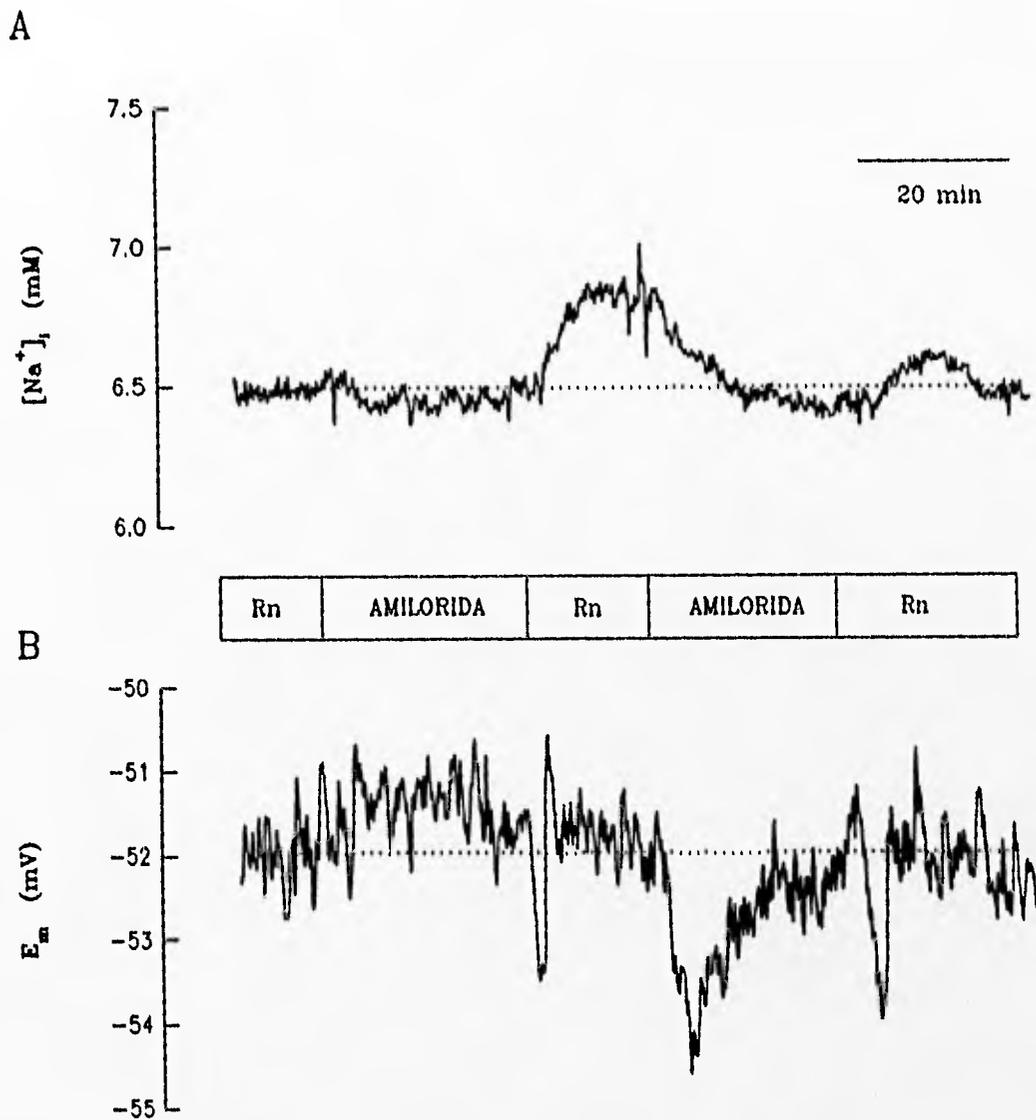


Figura 11. EFECTO DE LA AMILORIDA SOBRE LA [Na⁺]_i EN ESTADO ESTACIONARIO Y EL E_m EN REPOSO. Registro en una neurona 1F. (A) Nótese que la amilorida produce una disminución en la [Na⁺]_i, misma que rebota por arriba de la [Na⁺]_i basal cuando el fármaco es removido. (B) El registro del E_m presenta ligeros cambios al aplicar la amilorida.

Se ha demostrado en músculo liso y cardíaco, que el intercambiador Na^+/H^+ se estimula cuando el interior celular se acidifica. Esto trae como resultado una expulsión de H^+ en contra de su gradiente electroquímico (Aickin, 1988). Además, en neuronas Retzius de sanguijuela, tanto la amilorida como la remoción del Na^+ externo producen una inhibición en la recuperación del pH_i (Deitmer y Schlue 1983), demostrando así la existencia del intercambiador en estos tipos celulares, aunque, como se mencionó, las neuronas de *H. aspersa* parecen carecer del intercambiador Na^+/H^+ (Thomas, 1984). Sin embargo, los resultados aquí presentados sugieren que, contrario a lo que se cree, estas neuronas están dotadas del intercambiador Na^+/H^+ , lo cual a su vez sugiere que este mecanismo puede ser una de las vías de entrada de Na^+ durante la inhibición de la bomba de Na^+ así como en condiciones de reposo. Para confirmar la participación de este intercambiador en el transporte de Na^+ hacia el interior celular, se sometió a estas neuronas a una carga ácida intracelular, exponiéndolas a una solución conteniendo 20 mM de ácido propiónico. El ácido propiónico, por ser un ácido débil, permea a través de la membrana plasmática impulsado por su gradiente electroquímico (Sharp y Thomas, 1981). En la figura 12 se muestra el efecto del ácido propiónico sobre la $[\text{Na}^+]_i$ y el E_m en una neurona 1F en condiciones de reposo. Obsérvese en A que el ácido provocó un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ que revirtió al retornar a la solución Rn. En B, el registro de E_m experimentó una despolarización gradual durante la carga ácida.

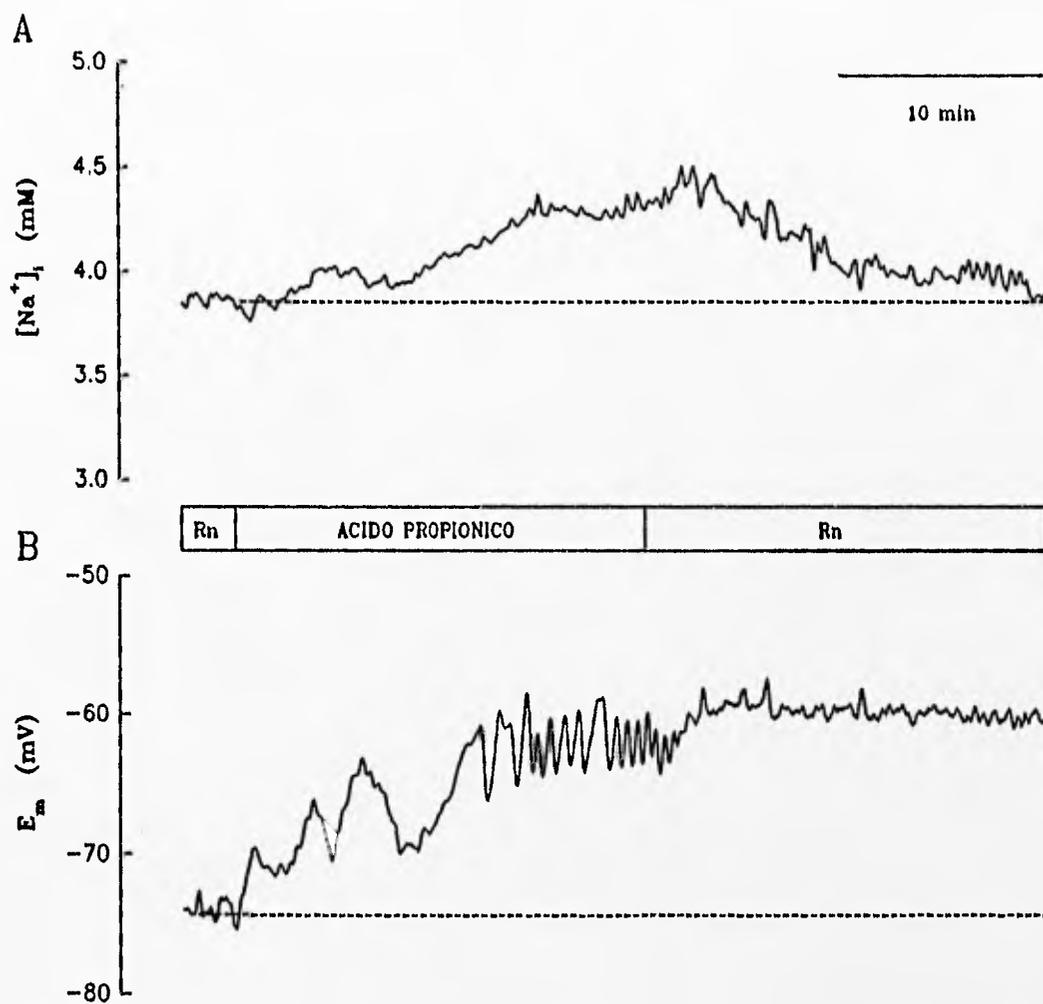


Figura 12. EFECTO DEL ACIDO PROPIONICO SOBRE LA $[Na^+]_i$ Y EL E_m . Registro en una neurona 1F. En A se ilustra que al aplicar el ácido propiónico se produce un incremento en la $[Na^+]_i$. Este aumento es gradual y revierte cuando se retorna a la solución Rn. En (B), el E_m muestra una despolarización gradual durante la acidificación.

3.5 Estudios preliminares del efecto de la TTX sobre la $[Na^+]_i$

Otra vía alternativa a través de la cual el Na^+ puede ser transportado hacia el interior celular es a través de canales de Na^+ voltaje-dependientes sensibles a TTX. Para demostrar en las neuronas de *H. aspersa* la posible entrada de Na^+ a través de canales de Na^+ sensibles a TTX, se estudió el efecto de $10 \mu M$ de TTX sobre la $[Na^+]_i$ tanto en condiciones de reposo como durante la inhibición de la bomba de Na^+ . En estos experimentos se siguieron los protocolos descritos para los experimentos de amilorida (sec. 3.4).

Aunque en los experimentos preliminares no existió cambio en la $d[Na^+]_i/dt$ al aplicar la TTX, respecto de la tasa control en ouabaina; se observó en 2 experimentos, una marcada hiperpolarización del E_m al aplicar la toxina. Además, siguiendo el protocolo 2, en otros experimentos, la TTX provocó una disminución de alrededor de 1 mM en la $[Na^+]_i$ basal. En las figuras 13 y 14, se muestran los registros siguiendo los protocolos descritos en la sección 3.4. En la figura 13, siguiendo el protocolo 1, se ilustra el registro en una neurona IF con la aplicación de $10 \mu M$ de TTX sobre el incremento en la $[Na^+]_i$ y el E_m . En A, no se observó ningún cambio en el curso temporal lineal de la $d[Na^+]_i/dt$ respecto del registro control (fig. 7A); sin embargo, el registro del E_m B, mostró una marcada hiperpolarización de aproximadamente 20 mV en respuesta a la TTX, lo que sugiere la supresión de una corriente entrante de Na^+ (I_{Na^+}), en condiciones de la inhibición de la bomba de Na^+ que no cambia sensiblemente la $[Na^+]_i$. En la figura 14 se ilustra el registro de una neurona IF con el efecto de la TTX sobre la $[Na^+]_i$ y el E_m en estado de reposo. En este experimento, la TTX produjo una disminución en la $[Na^+]_i$ de alrededor de 1 mM, (A).

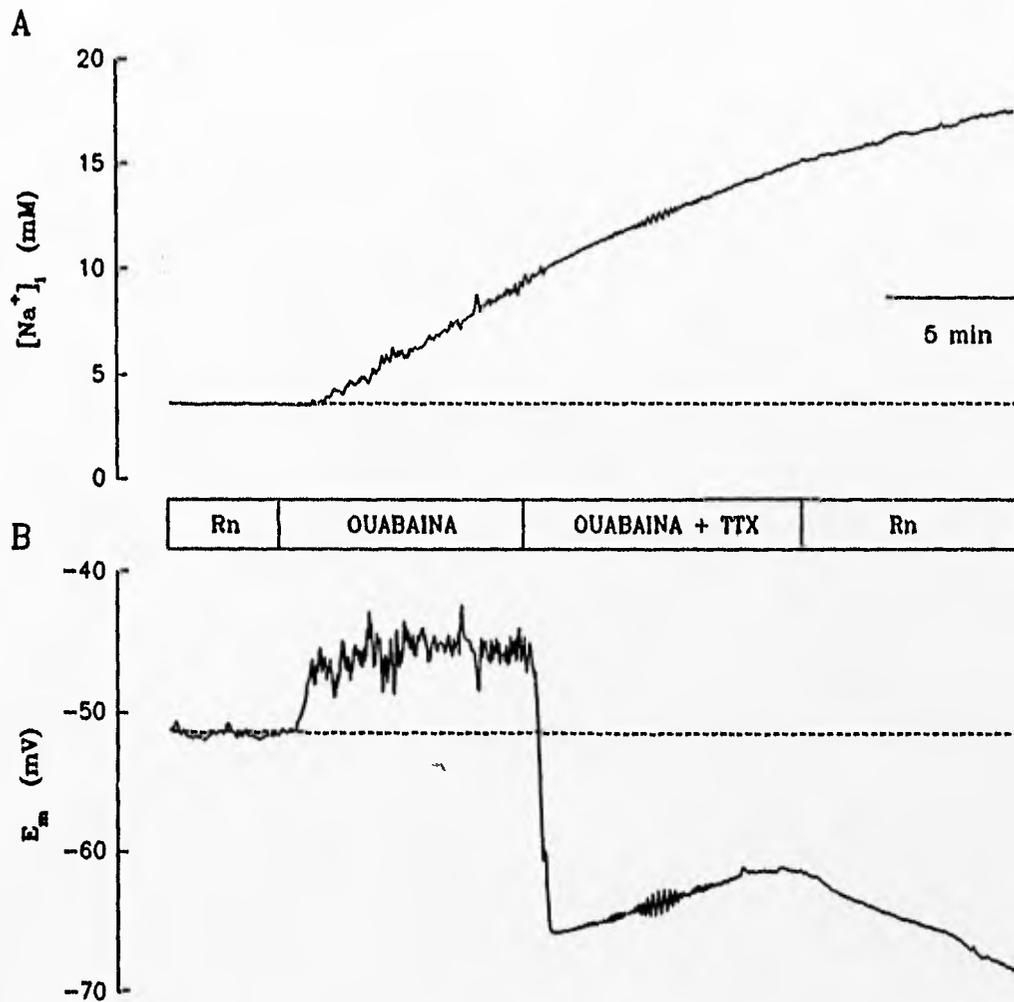


Figura 13. EFECTO DE LA TETRODOTOXINA (TTX) SOBRE EL E_m DURANTE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na^+ . Estos registros fueron obtenidos en una neurona 1F. (A) La aplicación de la TTX no produjo cambio en la $[\text{Na}^+]_i$, durante la inhibición continua de la bomba de Na^+ . (B) Sin embargo, la toxina produce una abrupta hiperpolarización en el E_m (aprox. 20 mV).

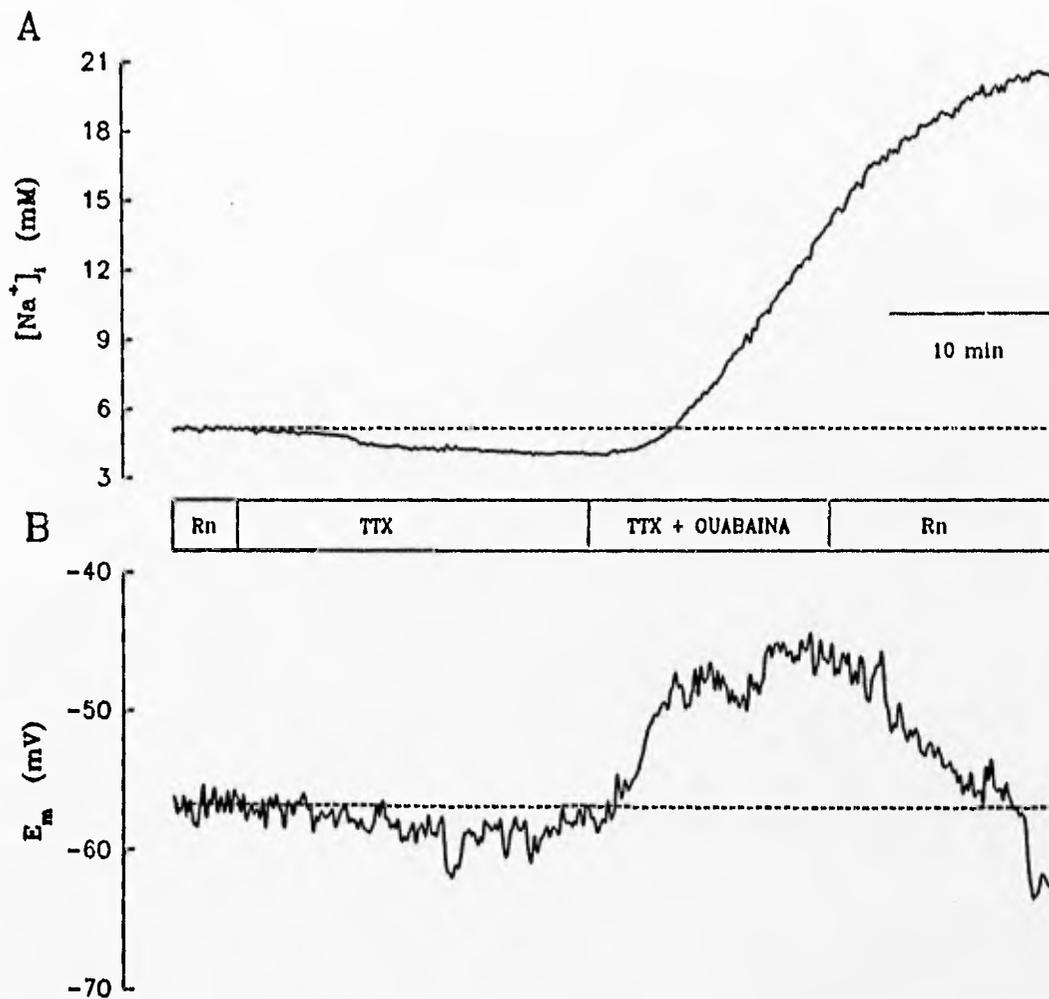


Figura 14. EFECTO DE LA TTX SOBRE LA $[Na^+]_i$ Y EL E_m EN REPOSO. Registro en una neurona 1F. En (A) se observa que al aplicar la TTX, la $[Na^+]_i$ sufre una disminución de alrededor de 1 mM a partir de su estado basal (línea punteada). (B) muestra el registro del E_m con una ligera hiperpolarización a partir de su estado de reposo, como es de esperarse al producirse el bloqueo de una I_{Na^+} . Además se observa la despolarización al aplicar la ouabaina.

4 DISCUSION

Las mediciones del VCA en neuronas de *H. aspersa* durante la inhibición sostenida de la bomba de Na^+ muestran que, contrario a las predicciones de la hipótesis de la "bomba y de la fuga", las células pierden más agua y solutos de los que ganan (Alvarez-Leefmans, Gamiño y Reuss, 1992). Con el objeto de explorar los flujos iónicos subyacentes a estos cambios del VCA, en el presente trabajo se midieron las tasas iniciales de cambio en las concentraciones intracelulares de Na^+ , K^+ y la actividad de Cl^- , durante la inhibición farmacológica de la bomba de Na^+ . Con los valores obtenidos se calcularon los flujos netos correspondientes, permitiendo estimar el balance osmótico y correlacionar estos resultados con los cambios observados en el VCA. Además se estudió farmacológicamente la naturaleza de algunas de las posibles vías de entrada de Na^+ en estas células, tanto en condiciones de reposo como durante la inhibición de la bomba de Na^+ . Estas vías de entrada de Na^+ , constituyen lo que tradicionalmente se conoce como la permeabilidad pasiva de sodio o "vías de fuga" de sodio.

4.1 Tasa de aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ y flujo neto de Na^+

Debido a que en el 35% de las células, la disminución del VCA durante la inhibición de la bomba de Na^+ es precedida por una o más fases de hinchamiento transitorio a una tasa inicial aproximada del 20%/min (Alvarez-Leefmans, Gamiño y Reuss, 1992), se midieron la $d[\text{Na}^+]_i/dt$ así como el Φ_{Na^+} para determinar si este catión (acompañado de un anión y agua) contribuye al incremento inicial en el VCA. En este trabajo, los resultados de la $d[\text{Na}^+]_i/dt$, así como los observados a partir de la corriente entrante de Na^+ (I_{Na^+}), (Alvarez-Leefmans, et al. 1994) no sobrepasaron el valor de 1.0 mM/min. Sin embargo, si consideramos el valor de 1 mM/min

como la tasa inicial máxima y suponemos que el Cl⁻ es el anión acompañante del Na⁺, entonces deberían de entrar 2 mM/min. Si consideramos que la osmolalidad del medio acuoso intracelular es similar a la del medio extracelular, es decir, 200 mOsmol/kg de agua, con las tasas observadas el hinchamiento celular podría ser de sólo 1%/min. Este valor se ubica muy por debajo del 20%/min observado experimentalmente. De aquí que la entrada de Na⁺, *per se*, además de su anión acompañante y agua, no explican la fase de hinchamiento inicial producido por la inhibición de la bomba de Na⁺ en el 35% de las células, y por lo tanto, otros factores, hasta ahora desconocidos, deben estar implicados en esta respuesta celular. Una posible explicación es que, ante el incremento en la [Ca²⁺]_i que ocurre al inhibir la bomba de Na⁺ (Alvarez-Leefmans, et al. 1994), este catión podría liberar partículas orgánicas osmóticamente activas en el interior celular, por ejemplo, mediante la activación enzimática que indujera la fragmentación de algún polímero (Chamberlin y Strange, 1989).

4.2 La ouabaína produce una disminución en la [K⁺]_i que podría contribuir con la disminución del VCA

En la mayoría de estas neuronas (70%), la ouabaína produce una disminución en el VCA de hasta un 6.5% a partir de su VCA inicial (Alvarez-Leefmans, Gamiño y Reuss, 1992). En el presente trabajo se midieron los flujos netos de K⁺ durante la inhibición de la bomba, para determinar si este catión contribuye a la respuesta osmótica mencionada. La $d[K^+]_i/dt$ fué de 1.4 mM/min. Si consideramos que la salida de K⁺ se acompaña, como lo requiere el principio de electroneutralidad, de un anión A⁻, entonces el cambio en la osmolalidad intracelular producido por la salida del par K⁺ y A⁻ debe ser de 2.8 mOsmol/kg de agua/min. Para obtener el balance

neto de las partículas osmóticamente activas cuando se abren los canales de K^+ al inhibirse la bomba de Na^+ , se sustrae la tasa de cambio en la osmolalidad intracelular resultado de la entrada neta de Na^+ y su anión acompañante (0.8 mosmol/kg de agua/min), de la tasa de cambio correspondiente a la salida del par K^+ y A^- (2.8 mOsmol/kg de agua/min). Estos cálculos indican que durante la inhibición de la bomba hay una pérdida neta de solutos de 2.0 mosmol/kg de agua/min, lo que se traduce en una tasa en la disminución del VCA de $\sim 1.0\%/min$. El valor de $\sim 1.0\%/min$ se encuentra cercano al experimentalmente observado de $1.7\%/min$ (Altamirano, 1993) y $2.7 \pm 1\%/min$ (Alvarez-Leefmans, Gamiño y Reuss, 1992). La salida de K^+ se debe principalmente a que durante la inhibición de la bomba se produce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Alvarez-Leefmans, et al. 1994). El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es de magnitud suficiente como para abrir canales de K^+ activados por Ca^{2+} (Latorre, et al. 1989). Por lo tanto, en neuronas de *H. aspersa*, el eflujo de K^+ durante la inhibición de la bomba de Na^+ podría darse a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+} intracelular (Alvarez-Leefmans, et al. 1994).

4.3 El Cl^- intracelular aumenta durante la inhibición de la bomba de Na^+ .

Para determinar si durante la disminución del VCA observada durante la inhibición de la bomba de Na^+ , el Cl^- es el anión que acompaña al K^+ , se estudió el efecto de la ouabaína sobre la $a_{Cl^-}^i$. Los resultados muestran que, contrario a lo esperado con base en antiguas observaciones que ubicaban al E_{Cl^-} por arriba del E_m , la inhibición de la bomba de Na^+ provoca un incremento en la $a_{Cl^-}^i$. Esto es posible sólo si E_{Cl^-} es más negativo que el E_m , de tal manera que haya una fuerza impulsora ($E_m - E_{Cl^-}$) dirigida hacia el interior celular. En efecto, en este trabajo se demostró que el E_{Cl^-} está dirigido hacia el interior celular con un gradiente eléctrico

de 13.6 mV. Obviamente el Cl⁻ no puede ser el anión que sale acompañando al K⁺ cuando se inhibe la bomba de Na⁺. Debe pues tratarse de algún otro anión cuya naturaleza, hasta el momento, se desconoce. Es posible que se trate de un anión orgánico, ej. la taurina u otros aminoácidos (Chamberlin y Strange, 1989, Pasantes-Morales y Martín del Río, 1990).

4.4 Correlación de los resultados obtenidos con la fisiopatología del daño neuronal postisquémico

Es bien sabido que las células nerviosas requieren del aporte continuo de glucosa y oxígeno para mantener el funcionamiento normal del cerebro. Durante los procesos isquémicos, al suspenderse total o parcialmente la irrigación sanguínea hacia un tejido o un órgano, se produce una disminución de ATP como consecuencia de la disminución o de la suspensión del aporte de O₂. Esto trae como resultado que todas las funciones celulares dependientes del ATP se inhiban, entre ellas la actividad de la bomba de Na⁺. Se acepta ampliamente que la inhibición de esta enzima conduce a una ganancia neta de solutos y agua, que culmina con el hinchamiento celular agudo responsable del daño celular. De aquí que el edema celular citotóxico sería consecuencia directa de la inhibición de la bomba de Na⁺ (Tosteson y Hoffman, 1960; Macknight y Leaf, 1977; Rosenberg, 1990). Sin embargo, estos puntos de vista no consideran el importante papel funcional que juegan los canales de K⁺ activados por el Ca²⁺ distribuidos en varios tipos celulares que van desde las neuronas de moluscos hasta las del cerebro del hombre (Llinás, 1988; Rudy, 1988).

Los resultados aquí presentados sugieren que en respuesta a la inhibición de la bomba de Na⁺ hay una pérdida neta de solutos y agua, por lo cual se produce una disminución en el

VCA. Estos hallazgos sugieren que el daño celular agudo resultante de la inhibición de la bomba de Na^+ puede deberse al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Siesjö, 1988; Nicotera, Bellomo y Orrenius, 1992), más que al edema celular coloidosmótico. La sobrecarga de Ca^{2+} desencadenaría reacciones adversas que causarían daño funcional y estructural irreversibles a mitocondrias, membrana plasmática, componentes del citoesqueleto y ADN, a través de la activación de enzimas como proteasas, lipasas y endonucleasas iniciándose así un proceso degradativo que culminaría con la muerte celular (Siesjö, 1988; Choi, 1990).

4.5 Naturaleza de las vías de entrada de Na^+ durante la inhibición de la bomba de Na^+ y en estado de reposo

La hipótesis de Tosteson y Hoffman, predice que la inhibición de la bomba de Na^+ produce un incremento en el VCA atribuible a la entrada de agua y iones, entre los que se encuentran principalmente el Na^+ y Cl^- . Sin embargo, aunque ya se ha discutido arriba lo insuficiente que resulta la entrada neta de estos iones para producir los cambios en el VCA postulados por esta hipótesis, se hizo necesario estudiar a través de medios farmacológicos, la naturaleza de algunas de las vías de entrada de Na^+ , tanto durante la inhibición de la bomba de Na^+ como en condiciones de reposo.

4.5.1 La amilorida y el ácido propiónico producen cambios en la $[\text{Na}^+]_i$

En varios tipos celulares se sabe que el intercambiador Na^+/H^+ es uno de los principales mecanismos reguladores del pH_i (Grinstein, García-Soto y Mason, 1988). Sin embargo, aunque se desconoce la existencia de este mecanismo en las neuronas de *H. aspersa*, se sabe que la

regulación del pH, en estas neuronas requiere de la presencia de Na^+ externo para energizar un sistema de contrartransporte de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Thomas, 1980).

En éstas y otras neuronas, las vías por las que el Na^+ permea pasivamente a través de la membrana plasmática no se conocen. En el presente trabajo se encontró que la amilorida provocó una disminución en la $[\text{Na}^+]$, en estado de reposo así como un cambio en la $d[\text{Na}^+]/dt$ durante la inhibición de la bomba de Na^+ . Estos datos sugieren que en estas células, existe una vía de entrada de Na^+ sensible a la amilorida.

Se sabe que la amilorida bloquea por lo menos tres vías distintas de transporte catiónico aparte del intercambiador Na^+/H^+ , estas son: el canal de Na^+ epitelial (Benos, 1988), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Kleyman y Cragoe, 1990), así como el canal catiónico mecanosensible (MS), en ovocitos de *Xenopus* (Lane, McBride y Hamill, 1991). Se desconoce la existencia en estas neuronas de un canal de Na^+ como el presente en epitelios. Los canales MS, se activarían por estiramiento de la membrana, lo cual es improbable en el caso particular que nos ocupa dado que las células disminuyen de volumen. Por otro lado, es poco probable, aunque no imposible, la existencia de una entrada de Na^+ en condiciones de reposo a través de los canales MS debido a que, en condiciones isosmóticas, las neuronas no se sometieron a estímulo mecánico alguno que pudiera provocar la activación de estos canales, excepto la perfusión misma. Los datos no son, sin embargo, suficientes para descartar la posibilidad de que al inhibir la bomba de Na^+ , los cambios inducidos en el VCA, en algunos casos, provoquen la activación de canales MS. De hecho, a estos canales se les ha asignado un papel importante en la regulación del volumen celular (Hamill, 1983; Christensen, 1987).

La posibilidad de que el efecto de la amilorida corresponda al bloqueo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es discutible, dado que si este mecanismo existiese en estas células, lo cual es motivo de controversia (Kennedy y Thomas, 1995), al aumentar la $[\text{Na}^+]_i$, debería de funcionar de manera inversa, de tal forma que si se bloquease, se produciría un aumento en la tasa de Na^+ más que una disminución de la misma (ver adelante). De suponer que existe el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en estas neuronas; es probable, al menos en el estado de reposo, que a través de este mecanismo se produzca una entrada de Na^+ acoplado con la salida de Ca^{2+} . Localizado en la membrana plasmática, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es un sistema de transporte secundario que regula la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Para su funcionamiento, utiliza la energía almacenada en el gradiente electroquímico del Na^+ . Cuando el potencial de equilibrio del intercambiador ($E_{\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}}$) es más negativo que el E_m , este mecanismo expulsa Ca^{2+} acoplado con una entrada de Na^+ , con una estequiometría de $3\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ (Bers, 1991). Sin embargo, como sucede en todo sistema de transporte por medio de acarreadores, el sentido en el que mueven ambas especies iónicas es reversible y depende de la magnitud y sentido del gradiente de las especies transportadas (en este caso Na^+ y Ca^{2+}). De esta manera, puede predecirse que un aumento modesto en la $[\text{Na}^+]_i$ (como ocurre al inhibir la bomba de Na^+), es suficiente para invertir el sentido de operación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Alvarez-Leefmas, Merediz y Fernández, 1994). De aquí que la entrada de Na^+ que se produce al inhibir la bomba de Na^+ y que genera a su vez el funcionamiento inverso de este mecanismo (ahora introduce Ca^{2+} acoplado con la expulsión de Na^+), hace nula la entrada de Na^+ a través de este mecanismo.

En resumen, en estas neuronas en condiciones de reposo, es probable que la amilorida pueda suprimir un influjo de Na^+ por lo menos a través de dos vías: 1) canales de Na^+ , como

los presentes en epitelios; 2) intercambiador Na^+/H^+ . Por otra parte, durante la inhibición de la bomba de Na^+ , es también probable que la amilorida pueda estar disminuyendo la entrada de Na^+ : 1) a través de los canales tipo epiteliales de Na^+ ; 2) a través de canales catiónicos mecanosensibles y, 3) a través del intercambiador Na^+/H^+ .

Sin embargo los experimentos de acidificación citosólica sugieren la presencia del intercambiador Na^+/H^+ en estas neuronas ya que al aplicar el ácido propiónico se produce un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ (fig. 12A). Esto sugiere que la acidificación citosólica estimula al intercambiador Na^+/H^+ , el cual genera un eflujo de H^+ acoplado con el influjo de Na^+ . Es probable que la recuperación de la $[\text{Na}^+]_i$ posterior a la eliminación del ácido de la solución del baño (fig. 12A), así como la disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ cuando se aplica la amilorida en condiciones de reposo (fig. 11A), sean producto de la actividad continua de fondo de la bomba de Na^+ . Así lo sugieren estudios en los que se ha conferido a la bomba de Na^+ el papel principal tanto en la recuperación en la $[\text{Na}^+]_i$ en presencia de la acidificación intracelular (Piwnicka-Worms, et al. 1985; Kaila y Vaughan-Jones, 1987); como en la disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ en tejidos quiescentes (que se acompaña por un descenso en el pH_i) al aplicar la amilorida (Deitmer y Ellis, 1980; Vaughan-Jones, 1988).

En estas neuronas, la disminución de este influjo de Na^+ en condiciones de reposo producido por la amilorida, sugiere una ligera caída en el pH_i . Esto es compatible con estudios en fibras de Purkinje de músculo cardíaco en las que la amilorida produce un ligero incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ acompañado por una caída en el pH_i (Vaughan-Jones, 1988). Además, es probable que en las neuronas de *H. aspersa* después de un periodo prolongado de inhibición de la bomba de Na^+ se produzca una acidificación intracelular como consecuencia de la acumulación de Ca^{2+}

a través del funcionamiento inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. De aquí que al inhibir el intercambiador Na^+/H^+ se produzca un cambio en la $d[\text{Na}^+]_i/dt$ que muy probablemente se vea acompañado de una caída considerable en el pH_i . En fibras de Purkinje la aplicación de amilorida produce una disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ 40 minutos después de haberse producido la inhibición de la bomba de Na^+ . Esta disminución se acompaña de una caída abrupta en el pH_i . La caída en el pH_i es producto de la suspensión de la regulación del pH_i a través del intercambiador Na^+/H^+ (Vaughan-Jones, 1988).

Con el uso de la técnica de MDSI, otras alternativas experimentales que confirmarían la presencia del intercambiador Na^+/H^+ en estas neuronas son las siguientes: 1) la medición simultánea de la $[\text{Na}^+]_i$ y del pH_i , tanto en presencia de amilorida como durante la acidificación intracelular con NH_4Cl ; 2) la medición simultánea de estas dos variables ($[\text{Na}^+]_i$ y pH_i) al aplicar amilorida en presencia de la inhibición prolongada de la bomba de Na^+ con ouabaina; 3) la medición de los cambios en el pH_i que durante la acidificación intracelular con NH_4Cl producen tanto la amilorida como la remoción del Na^+ extracelular. 4) Medir las dos variables anteriores en presencia de inhibidores más potentes del intercambiador Na^+/H^+ (ej.: Metil Isobutil Amilorida).

Finalmente, sería interesante utilizar técnicas de inmunofluorescencia para detectar, con anticuerpos monoclonales, la presencia del intercambiador, así como la isoforma que posiblemente se encuentre en estas células.

4.5.2 La TTX produce una disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ en condiciones de reposo

En este trabajo, los experimentos preliminares no mostraron cambios entre la $d[\text{Na}^+]_i/dt$

observada en TTX durante la inhibición de la bomba de Na^+ respecto al control en ouabaina. Es decir, en estos experimentos encaminados a mostrar que durante la inhibición de la bomba de Na^+ se produce una entrada de este catión a través de canales de Na^+ voltaje-dependientes bloqueables por TTX, al parecer no mostraron ningún efecto de la droga. Sin embargo, la existencia de una disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ (1 mM) al aplicar la TTX en condiciones de reposo celular (fig. 14A), así como la hiperpolarización del E_m (20 mV) ante la aplicación de esta toxina en presencia de la inhibición de la bomba de Na^+ (figura 13B), son hallazgos que sugieren en estas neuronas, la existencia de una entrada de Na^+ a través de canales de Na^+ voltaje-dependientes sensibles a TTX.

La disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ inducida por TTX en condiciones de reposo sugiere la presencia de canales de Na^+ voltaje-dependientes activos a potenciales de transmembrana en reposo (Gilly y Armstrong, 1984), es decir, de entre -50 y -60 mV. Es probable que esta disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ al aplicar la TTX en el estado de reposo se deba a la actividad de fondo la bomba de Na^+ , al igual que sucede con la disminución en la $[\text{Na}^+]_i$ al aplicar la amilorida.

Por otra parte, si consideramos el efecto hiperpolarizante de la TTX sobre el E_m bajo condiciones de la inhibición de la bomba de Na^+ , que en el mayor de los casos fué de aproximadamente 20 mV (fig. 13B); y suponemos que la capacitancia específica de la membrana plasmática (es decir, la cantidad de carga eléctrica que retiene cuando existe a través de ella una diferencia de potencial de 1 V) es de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Miles, 1969); entonces, con la siguiente expresión se puede conocer la cantidad de carga eléctrica transportada por el Na^+ involucrada en generar este cambio en el E_m :

$$C = q_m / \Delta E_m \quad (9)$$

donde C es la capacitancia de la membrana en faradios (F); q_m es la cantidad de carga en coulombios (C) y ΔE_m es la diferencia de potencial en voltios (V).

Por lo tanto:

$$q_m = C \cdot \Delta E_m \quad (10)$$

Substituyendo valores:

$$q_m = (1 \cdot 10^{-6}) \cdot (20 \cdot 10^{-3})$$

De esta manera:

$$q_m = 2 \cdot 10^{-8} \text{ C}$$

Pero como $1 \text{ g} \cdot \text{mol} = 96487 \text{ C}$ (aproximadamente 10^5 C). Entonces:

$$q_m = 2 \cdot 10^{-8} / 10^5$$

Por lo que:

$$q_m = 2 \cdot 10^{-13} \text{ g} \cdot \text{mol}$$

Es decir, sólo se requiere la transferencia de 0.2 pmol/cm^2 de Na^+ para generar un cambio de 20 mV en el E_m . De aquí que en estos estudios preliminares, la inexistencia de cambio en la $d[\text{Na}^+]/dt$ al aplicar TTX durante la inhibición sostenida de la bomba de Na^+ (fig. 13A), es debida probablemente a la resolución limitada de la técnica de MDSI en la detección de concentraciones iónicas (en este caso de Na^+). Si consideramos en estas neuronas, que

concentraciones iónicas del orden picomolar (10^{-12}) producen un cambio de 20 mV en el E_m , y asumimos que el electrodo posee un límite de detección del orden micromolar (10^{-6}) (Ammann, 1986); es de esperarse que sería imposible la detección de concentraciones iónicas un millón de veces inferiores a los que el electrodo permite medir. Ahora, como este desplazamiento ha llevado al E_m a valores más negativos, es decir, una hiperpolarización (fig. 13B); esto quiere decir que la TTX ha suprimido una cantidad de carga transportada por el Na^+ a través de canales de Na^+ sensibles a TTX, equivalente a $0.2 \text{ } \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, cantidad que es capaz de producir este desplazamiento de voltaje (20 mV) en el E_m .

En estas neuronas quedan por dilucidar algunas otras vías de entrada de Na^+ que en este trabajo no se consideraron experimentalmente. Por ejemplo el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el sistema de triple cotransporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$, así como el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ .

5 CONCLUSIONES

1.- Cuando se inhibe la bomba de Na^+ con ouabaína (1 mM), las neuronas de *H. aspersa* pierden más solutos osmóticamente activos de los que ganan. Como resultado, estas células en lugar de "hincharse" disminuyen su VCA. Este resultado contradice las predicciones elementales de la hipótesis de Tosteson y Hoffman.

2.- El E_{Cl^-} en las neuronas de *H. aspersa* es más negativo que el E_m , por lo que el gradiente electroquímico del Cl^- al estar dirigido hacia el interior celular, no favorece la salida de este anión acompañando al K^+ cuando se inhibe la bomba de Na^+ . Por lo tanto, otro anión

cuya naturaleza se desconoce, es quien acompaña al K^+ .

3.- En estas neuronas, una de las vías de entrada de Na^+ se da a través de un sistema de transporte sensible a amilorida. Se trata probablemente del intercambiador Na^+/H^+ .

4.- Estas neuronas presentan un aporte continuo de Na^+ a través de canales de Na^+ sensibles a TTX, los cuales se encuentran activos a potenciales de transmembrana en reposo (-50 a -60 mV).

6 REFERENCIAS

Aickin, C.C. (1988). Movement of acid equivalents across the mammalian smooth muscle cell membrane. En: proton passage across cell membranes (Ciba Found. Symp. 139) Wiley, Chichester pp 3-22.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson J.D. (1994). Molecular biology of the cell. Garland Publishing. E.U.A. 1294 p.

Altamirano, J. (1993). Corrientes iónicas generadas a través de la membrana de una neurona resultantes de la inhibición de la bomba de Na^+/K^+ y su relación con los mecanismos de mantenimiento y regulación del volumen celular. Tesis Lic. Fac. Ciencias. UNAM.

- Alvarez-Leefmans, F.J., Giraldez, F. y Russel, J.M. (1990a). Methods for measuring chloride transport across nerve, muscle and glial cells. En: Alvarez-Leefmans, F.J. y Russell, J.M. (eds) Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glial cells. New York, Plenum. pp 3-66.
- Alvarez-Leefmans, (1990b). Intracellular Cl⁻ regulation and synaptic inhibition in vertebrate and invertebrate neurons. En: Alvarez-Leefmans, F.J. y Russell, J.M. (eds) Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glial cells. New York, Plenum. pp 109-158.
- Alvarez-Leefmans, F.J. Gamiño, S.M., Giraldez, F. y González-Serratos, H. (1986). Intracellular free magnesium in frog skeletal muscle fibers measured with ion-selective micro-electrodes. *J. Physiol. (Lond)* 378:461-483.
- Alvarez-Leefmans, F.J., Gamiño, S.M. y Reuss, L. (1992). Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol. (Lond)* 458:603-619.
- Alvarez-Leefmans, F.J., (1992b). Extracellular reference electrodes En: Kettenmann, H. y Grantyn, R. (eds) Practical electrophysiological methods. E.U.A. WILEY-LISS pp 171-182.
- Alvarez-Leefmans, F.J., Cruzblanca, H., Gamiño, S.M., Altamirano, J., Nani, A. y Reuss, L. (1994). Transmembrane ion movements elicited by sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurons. *J. Neurophysiol.* 71(5):1787-1796.

- Alvarez-Leefmans, F.J., Merediz, A.G. y Fernández, J.R. (1994). Consecuencias de la inhibición de la bomba de Na^+ en neuronas y su relevancia en la fisiopatología del daño celular producido por isquemia anóxica. *Gaceta Médica de México*. 130(5):347-354.
- Alvarez-Leefmans, F.J., Reuss, L. (1996). Operación orquestada de los sistemas de transporte a través de membrana: Regulación y mantenimiento del volumen celular. Cap. 7 en: Latorre, R., Barneo, J. L., Llinás, R. y Bezanilla, F. (eds.). *Fisiología y Biofísica de la célula: Un estudio de la estructura y mecanismos de la membrana celular*.
- Ammann, D. (1986). *Ion selective microelectrodes*. Berlin, Springer-Verlag. 346 p.
- Balanyi, K. y Grafe, P. (1988). Cell volume regulation in the nervous system. *Renal Physiol. Biochem.* 3(5):142-157.
- Barolet, A.W., Andrews, R. y Morris, M. (1989). Calibration of ion selective Microelectrodes: Flow-system and Analysis Program for the IBM PC. *J. of Neurosci. Meth.* 30:263-266.
- Benos, D.J. (1988). Inhibitors and ligands of the Na^+/H^+ exchanger. Amiloride: Chemistry, kinetics, and structure-activity relationship. Cap. 8 en: Grinstein, S. (ed) Na^+/H^+ Exchange. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp 122-133.
- Bers, D.M. (1991). Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Academic Publishers. The Netherlands. pp 71-92.
- Chamberlin, M.E. y Strange, K. (1989). Anisosmotic cell volume regulation: A comparative view. *Am. J. Physiol.* 257 (Cell Physiol. 26). C159-C173.

- Choi, D.W. (1990). Cerebral hypoxia: Some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.* 10:2493-2501.
- Christensen, O. (1987). Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx through stretch-activated channels. *Nature* 330:66-68.
- Deitmer, J. W. y Ellis, D. (1980). Interaction between the regulation of intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac purkinje fibers. *J. Physiol. (Lond)* 304:471-488.
- Deitmer, J.W. y Schlue, W.R. (1983). Intracellular Na^+ and Ca^{2+} in leech *Retzius* neurones during inhibition of the Na^+/K^+ pump. *Flügers Archiv.* 379:195-201.
- Eisenman, G. (1967). Glass electrodes for hydrogen and other cations. Principles and Practice. Marcel Dekker, INC., New York. 582 p.
- Grinstein, S., García-Soto, J. y Mason, M. (1988). Differential role of cation and anion exchange in lymphocyte pH regulation En: Bock, G., Marsh, J. (eds). Proton passage across cell membrane. Ciba Found. Simp 139. John Wiley & Sons. E.U.A. pp 70-86.
- Grinstein, S. (1988). Na^+/H^+ Exchange. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 359 p.
- Hamill, O.P. (1983). Potassium and Chloride channels in red blood cells. En: Single Channel Recording. eds: Sakmann, B. y Neher, E. New York. Plenum press. pp 451-471.
- Heinemann, H. y Arens, J. (1992). Production and calibration of ion-sensitive microelectrodes. En: Kettenmann, H., Grantyn, R. (eds) Practical electrophysiological methods. E.U.A. WILEY-LISS, pp 206-212.

- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc. E.U.A. 607 p.
- Kaila, K. y Vaughan-Jones, R.D. (1987). Influence of sodium-hydrogen exchange on intracellular pH, sodium and tension in sheep cardiac purkinje Fibers. *J. Physiol. (Lond)* 390:93-118.
- Kandel, E. (1980). The multichannel model of the nerve cell membrane: A perspective En: Koester, J. y Byrne, J. (eds) *Molluscan nerve cells: From biophysics to behavior*. Cold Spring Harbor Laboratory. E.U.A. (1):1-10.
- Kennedy, H.J. y Thomas, R.C. (1995). Intracellular calcium and its sodium-independent regulation in voltage-clamped snail neurones. *J. Physiol. (Lond)* 484.3:533-548.
- Kerkut, G.A., Lambert, J.D., Gayton, R.J., Loker, J.E. y Walker, R.J. (1975). Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A:1-25.
- Kleyman, T.R. y Cragoe, Jr. E.J. (1990). Cation transport probes: the amiloride series. *Meth. Enzymol.* 191:739-754.
- Lane, J.W., McBride, D.W. y Hamill, O.P. (1992). Structure-activity relations of amiloride and its analogues in blocking the mechanosensitive channel en *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 106:283-286.
- Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P. y Alvarez, O. (1989). Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 51:385-389.

- Llinás, R. (1988). The Intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central nervous system function. *Science Wash. DC* 242:1654-1664.
- Macknight, A.D.C. y Leaf, A. (1977). Regulation of cell volume. *Physiol. Rev.* 57:510-573.
- Miles, F.A. (1969). *Excitable Cells*. Heinemann Medical Books Limited. London 147p.
- Nicolsky, B.P. (1937). Theory of the glass electrode. *Acta physicochimica. U.R.S.S.* 7,597.
- Nicotera, P., Bellomo, G., y Orrenius, S. (1992). Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:449-470.
- Ortells, M.O. y Lunt, G.G. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *TINS* 18:121-127.
- Parsons, R. (1959). *Handbook of electrochemical constants*. Londres: Butterwoths Scientific Publications.
- Pasantes-Morales, H. y Martín del Rfo, R. (1990). Taurine and mechanisms of cell volume regulation. En: Pasantes-Morales, H., Martin, D.L., Shain, W. y Martín del Rfo, R. (Eds). *Taurine: Functional neurochemistry, physiology and cardiology*. Progress in Clinical and Biological Research. Wiley-Liss, Inc. 351:317-328.
- Piwnica-Worms, D., Jacob, R., Horres, R.C. y Lieberman, M. (1985). Na^+/H^+ exchange in cultured chick heart cells-pH_i regulation. *J. Gen. Physiol.* 85:43-64.

- Rand, R.P. y Burton, A.C. (1964). Mechanical properties of red cell membranes. I. Membrane stiffness and intracellular pressure. *Biophys. J.* 4:115-135.
- Reuss, L. (1985). Changes in cell volume measured with an electrophysiologic technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:6014-6018.
- Rosenberg, G.A. (1990). *Brain fluids and metabolism*. Oxford University Press. E.U.A. 207 p.
- Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K^+ channels. *Neuroscience* 25:729-749.
- Sharp, A.P., Thomas, R.C. (1981). The effects of chloride substitution on intracellular pH in crab muscle. *J. Physiol. (Lond)* 312:71-80.
- Siesjö, B.K. (1988). Historical overview: Calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 522:638-661.
- Seo, J.T., Larcombe-McDouall, J.B., Case, R.M. y Steward, M.C. (1995). Modulation of Na^+/H^+ exchange by altered cell volume in perfused rat mandibular salivary gland. *Journal of Physiology (Lond)* 487.1 pp 185-195.
- Syková, E., Hník, P. y Vyklický, L., (1981). *Ion selective microelectrodes and their use in excitable tissues*. New York. Plenum.
- Thomas, R.C. (1969). Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. *Journal of Physiol. (Lond)* 201 pp 495-514.
- Thomas, R.C. (1980). Regulation of intracellular Na^+ , K^+ and H^+ concentrations in snail neurons. En: Koester, J. y Byrne, J. (eds). *Molluscan nerve cells: From biophysics to behavior*. Cold Spring Harbor Laboratory. E.U.A. pp 65-72.

- Thomas, R.C., Cohen, C.J. (1981). A liquid ion-exchanger alternative to KCl for filling. *Pflügers Arch.*, 390:96-98.
- Thomas, R.C. (1984). Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. Review Lecture. *J. Physiol. (Lond)* pp 3P-22P.
- Tosteson, D.C. y Hoffman, J.F. (1960). Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.* 44:169-194.
- Vaughan-Jones, R.D. (1988). Regulation of intracellular pH in cardiac muscle En: Bock, G., Marsh, J. (eds). *Proton passage across cell membrane. Ciba Found. Simp 139.* John Wiley & Sons. E.U.A. pp 23-46.
- Vaughan-Jones, R.D. y Aickin, C.C. (1987). Ion selective microelectrodes. En: Standen, N.B., Gray, P.T.A. y Whitaker, M.J. (eds) *Microelectrodes techniques.* Cambridge: The Company of Biologist. pp 137-166.
- Warnock, D.G., Yang, W., Huang, Z. y Cragoe, E. (1987). Interactions of Chloride and amiloride with the renal Na^+/H^+ antiporter. *J. of Biological Chemistry.* 263(15):7216-7221.